

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**DETERMINACIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA DE *Campylobacter jejuni*
Y *Campylobacter coli* EN CEPAS NATIVAS MEXICANAS**

Por

Biól. GUADALUPE ISMAEL MALAGÓN SANTIAGO

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS con Acentuación en Microbiología**

Mayo, 2009

**DETERMINACIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA DE *Campylobacter jejuni*
Y *Campylobacter coli* EN CEPAS NATIVAS MEXICANAS**

Comité de Tesis

Dr. José Santos García Alvarado

Director de Tesis

Dra. Norma L. Heredia

Secretario

Dr. Juan Francisco Contreras Cordero

Vocal

M. C. Luisa Yolanda Solís Soto

Suplente

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico que me brindó al otorgarme la beca para realizar mis estudios de Maestría.

Mi más profundo agradecimiento al Dr. José Santos García Alvarado y a la Dra. Norma L. Heredia, quienes me han recibido y me brindaron su aceptación y apoyo para realizar la presente investigación en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos a su cargo. Además de sus consejos y orientación para crecer como profesionista en todos los aspectos referente a la investigación científica.

Quiero agradecer muy especialmente al Dr. Juan Francisco Contreras Cordero, por las facilidades otorgadas para realizar parte de mi investigación en su laboratorio. De la misma manera quiero agradecer a la M.C. Griselda Menchaca Rodríguez por su ayuda, asesoría y valiosos consejos.

Una mención especial de agradecimiento a mis compañeros del laboratorio, con quien compartí la mayor parte del tiempo aquí en Monterrey, Alma Solís, M.C. Luisa Yolanda Solís, Biól. Esteban Maldonado, Q.F. B. Nydia Azenedh Orue Arreola, Aldo Gpe. Galván, Q.B.P. Sandra Castillo, Q.F.B. Rosa Ma. Casillas, Q.F.B. Diana Valtierra, Q.F.B. Mayra Gómez Govea, M.C. Eduardo Sánchez, Q.B.P. Nereida Rivera Rodríguez, P.T.Q.I. Mayra Elianet Casas Rodríguez y M.C. Herlinda Fabiola Venegas García. Quienes compartieron conmigo esta etapa de estudios y trabajo en el laboratorio, y han contribuido a mi crecimiento profesional.

A mis amigos y compañeros del Postgrado de esta universidad, a Q.B.P. Edith Rubio, Biól. Mónica Reyes, Biól. Antonio Cortez, Dra. Karina Gómez, Dra. Aída Rodríguez García, Q.B.P. Diana Fabiola Miranda Hernández, Q.B.P. Fernanda Thompson y Q.B.P. Vianey González, quienes compartieron conmigo su tiempo y amistad, me ayudaron a crecer como persona y como profesionista.

A todos mis maestros de Licenciatura de la Universidad Autónoma de Querétaro, especialmente al M.C. José Castillo Tovar, Dra. Guadalupe Malda, Dra. Maricela Gómez, Dr. Luis Hernández y Dr. Humberto Suzán Aspiri, quienes me iniciaron en el fascinante mundo de la ciencia y la biología, por sus valiosos consejos y motivación para seguir preparándome en esta disciplina tan maravillosa. De ellos quiero hacer una mención especial al M.C. José Castillo Tovar por ser más que un maestro para mí, a quien le agradezco todo su apoyo y confianza, por todas sus enseñanzas dentro y fuera de la escuela, y por creer en mí. Estoy infinitamente agradecido de haberlo conocido y ser su alumno, como parte de la élite que mantuvo a su lado en el área más especial que hay, la Microbiología.

LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, bajo la dirección del Dr. José Santos García Alvarado y la codirección de la Dra. Norma L. Heredia.

El presente trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el proyecto SEP-2004-C01-47767.

DEDICATORIA

A mis padres Adela Santiago de Vicente y Leandro Malagón López quienes me dieron la vida y me enseñaron a trabajar, así como el valor de la familia. Gracias a su apoyo y sacrificios he logrado culminar una etapa más de mi vida.

A mis hermanas Gabriela Malagón Santiago, María Perla Malagón Santiago y María José Malagón Santiago, por su apoyo, cariño y sacrificios que han realizado para yo poder cumplir una meta más durante mi estancia en esta ciudad.

A mis primos, tíos y abuelos por su cariño, consejos y paciencia. A pesar de la distancia, siempre están conmigo. Siempre apoyándonos entre nosotros, siempre unidos como la gran familia que somos.

A Aída Rodríguez, la persona más especial que he conocido en mi vida. Por su amistad y cariño, por aguantarme y comprenderme, por compartir todos esos momentos especiales dentro y fuera de la escuela, por su ayuda y consejos, por estar siempre conmigo a pesar de la distancia y por enseñarme su forma de ver y disfrutar la vida plenamente.

A Dios quien le agradezco todo, y por quien sin él yo no estaría aquí.

Tabla de contenido

Sección	Página
1. RESUMEN.....	5
2. INTRODUCCIÓN.....	7
3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	8
4. HIPÓTESIS	9
5. OBJETIVOS.....	10
5.1 OBJETIVO GENERAL	10
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	10
6. ANTECEDENTES	11
6.1 <i>Campylobacter</i> sp.....	11
6.2 Factores de Virulencia de <i>Campylobacter</i>	12
6.2.1 Tipificación.....	12
6.2.2 Movilidad, adhesión e invasión	13
6.2.3 Toxinas	14
6.2.4 Quimiotaxis	16
6.2.5 Cápsula	16
6.2.6 Hierro.....	17
6.2.7 Plásmido <i>pVir</i>	18
6.3 <i>Campylobacter</i> en México	18
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
7.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	20
7.2 PCR Multiplex	22
7.3 Cultivo y mantenimiento de células Vero	22
7.4 Ensayos de movilidad.....	23
7.5 Ensayos de Quimiotaxis	24
7.6 Ensayos de hemólisis	26
7.7 Ensayos de adherencia e invasión celular	27
7.7.1 Visualización de las bacterias invasivas por el método AO-CV	28
7.8 Ensayos de citotoxicidad de CDT sobre células Vero.....	29
a) Producción de la CDT.....	29
b) Ensayos de citotoxicidad.....	30
7.9 Análisis Estadísticos.....	31
7.9.1 Análisis de Componentes Principales.....	31

7.9.2 Escalamiento Multidimensional (ALSCAL)	32
7.9.3 Análisis de Correlación Múltiple	32
8. RESULTADOS	33
8.1 Tipificación de las cepas de <i>C. coli</i> y de <i>C. jejuni</i>	33
8.2 Movilidad	34
8.2.1 Prueba de Kruskal-Wallis para evaluar la Movilidad	35
8.3 Quimiotaxis	36
8.3.1 Prueba de Friedman para evaluar la Quimiotaxis	40
8.4 Hemólisis	40
8.4.1 Prueba de Friedman para evaluar la Hemólisis	42
8.5 Ensayos de Adhesión, Invasión y Citotoxicidad	42
a) Viabilidad de la línea celular Vero	42
b) Adhesión e Invasión Celular	43
c) Prueba de ANOVA para evaluar la Adhesión e Invasión Celular	45
d) Citotoxicidad	46
d) Prueba de ANOVA para evaluar la Citotoxicidad	48
8.6 Análisis estadísticos adicionales	48
8.6.1 Modelación matemática de <i>Campylobacter</i> sp.	48
8.6.2 Análisis Multivariantes	49
9. DISCUSIÓN	52
10. CONCLUSIONES	57
11. LITERATURA CITADA	58
12. APÉNDICES	76
APÉNDICE A. - ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	76
A1. MODELACIÓN MATEMÁTICA DE <i>Campylobacter</i> sp.	76
A2. ENSAYOS DE MOVILIDAD	79
A3. ENSAYOS DE QUIMIOTAXIS	86
A4. ENSAYOS DE HEMÓLISIS	92
A5. ENSAYOS DE ADHESIÓN E INVASIÓN CELULAR	92
A6. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD	100
A7. ANÁLISIS MULTIVARIANTES	104
APÉNDICE B. - MEDIOS DE CULTIVO, SOLUCIONES Y REACTIVOS	111
B1. MEDIOS DE CULTIVO	111
B2. SOLUCIONES Y REACTIVOS	112

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Ensayo de Movilidad.....	23
2. Ensayo de Quimiotaxis.....	24
3. Ensayo de Hemólisis.....	26
4. Ensayo de Adhesión e Invasión Celular.....	28
5. Ensayo de Citotoxicidad.....	31
6. PCR-Multiplex para diferenciar a <i>C. coli</i> de <i>C. jejuni</i>	33
7. Movilidad de las cepas en medio de cultivo semisólido con TTC.....	34
8. Ensayo de Quimiotaxis con <i>Campylobacter</i> sp.....	38
9. Halos de migración bacteriana por efecto de los Agentes Quimiotácticos.....	38
10. Hemólisis tipo Beta de las cepas de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i>	41
11. Hemólisis tipo Alfa de las cepas de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i>	41
12. Línea Celular Vero.....	43
13. Visualización de las células de <i>C. jejuni</i> 5653 en las células Vero.....	45
14. Ensayos de citotoxicidad.....	47
15. Citotoxicidad de la CDT en la línea celular Vero.....	47

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica	Página
1. Movilidad de las cepas de <i>C. jejuni</i> (A) y <i>C. coli</i> (B).....	35
2. Muerte celular de Vero por efecto de la CDT de <i>Campylobacter</i>	46
3. Gráfico de Sedimentación.....	50
4. Escalamiento Multidimensional métrico (ALSCAL).....	51

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Cepas de <i>Campylobacter</i> utilizadas.....	21
II. Primers empleados para la PCR-Multiplex de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i>	22
III. Ensayos de Quimiotaxis de de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i>	25
IV. Actividad hemolítica de las cepas.....	27
V. Adherencia e invasión de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> sobre Vero.....	28
VI. Análisis estadísticos.....	32
VII. Movilidad de las cepas de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i>	35
VIII. Prueba de Kruskal-Wallis (H) para la movilidad de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i>	36
IX. Quimiotaxis de las cepas de <i>C. jejuni</i>	37
X. Quimiotaxis de las cepas de <i>C. coli</i>	37
XI. Quimiotaxis de las 32 cepas analizadas en contacto con aminoácidos a pH < 7.0.....	39
XII. Prueba de Friedman para los ensayos de Quimiotaxis.....	40
XIII. Actividad hemolítica de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i>	42
XIV. Adhesión e Invasión de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> en Vero.....	44
XV. ANOVA para la Adhesión e Invasión de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i>	45
XVI. ANOVA para la Citotoxicidad de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i>	48
XVII. Modelos matemáticos de las curvas de calibración de <i>Campylobacter</i> sp.....	49
XVIII. Varianza Total Explicada del ACP.....	49
XIX. Matriz de Componentes.....	50

1. RESUMEN

Los miembros del género *Campylobacter* son considerados los principales agentes causales de gastroenteritis bacteriana en el mundo. *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* son las cepas con mayor incidencia, sin embargo, en México existe escasa información de estos patógenos. El objetivo general de este trabajo fue determinar la producción de los factores de virulencia: movilidad, quimiotaxis, hemólisis, toxina distensora citoletal (CDT), adhesión e invasión celular de 32 cepas nativas de *C. jejuni* y *C. coli*. La movilidad se determinó utilizando la técnica de pozos en agar. En la quimiotaxis se evaluaron nueve agentes quimiotácticos con la técnica HAP's (hard agar plugs). Para la hemólisis, las cepas se incubaron en una atmósfera con 33% de CO₂ a 35°C. La adhesión e invasión celular y la CDT se evaluaron usando como modelo la línea celular Vero. El 53% de las cepas fueron móviles. Su comportamiento quimiotáctico fue alterado por los repelentes a pH 7.0 y por los atrayentes L-glutamato y ácido aspártico a pH < 7.0. En todas las cepas se detectó actividad hemolítica tipo alfa y beta, además de un efecto citotóxico en las células Vero por acción de la CDT. En *C. jejuni* se observó mayor adhesión celular y menor invasión celular, comparado con *C. coli*. Un Análisis de Componentes Principales (ACP) aplicado a estos factores de virulencia, reveló que la virulencia de estas bacterias puede ser explicada por dos componentes: 1) los componentes de la membrana celular, y 2) la movilidad celular.

ABSTRACT

In the world, *Campylobacter* strains are recognized as the most common pathogens that cause foodborne bacterial gastroenteritis in humans. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* both are the most frequently isolated and related with campylobacteriosis, nevertheless there is not much information about these pathogens in Mexico. The goal of this work was to determine the virulence factors: motility, chemotaxis, haemolysis, cytotoxic distending toxin (CDT) adhesion cellular and invasion cellular in 32 natives strains of *C. jejuni* and *C. coli*. The motility was evaluated using the well-agar technique. The chemotactic behavior was evaluated with nine chemotactic agents with HAPs technique (hard agar plugs). The bacterial strains were incubated in 33% of CO₂ atmosphere at 35°C for hemolytic activity detection. Vero cells were used as model for to evaluate adhesion cellular, invasion cellular, and CDT production. The 53% of strains were motile. All chemorepellents at pH 7.0, and only L-glutamate and aspartic acid (both chemoattractants) at pH < 7.0 altered the bacterial behavior. In all strains we detected alpha-hemolytic-like activity (α -HLA), beta-hemolytic-like activity (β -HLA), and cytotoxic effects in VERO cells by CDT. *C. jejuni* strains were more adherents and minus invasives than *C. coli* strains. A Principal Components Analysis (PCA) applied for all virulence factors, revealed that the virulence of both pathogens can be explicated by two principal factors: 1) components of cellular membrane, and 2) cellular motility.

2. INTRODUCCIÓN

El investigar la composición química y expresión genética que los microorganismos poseen nos ayuda a comprender mejor su acción. La patogenicidad que poseen algunos de ellos como *C. jejuni* varía debido a la expresión de sus factores de virulencia. Actualmente, algunos microorganismos patógenos de interés para el hombre incluyen a *Salmonella* sp., *Escherichia* sp., *Vibrio* sp., *Streptococcus* sp., *Clostridium* sp., *Campylobacter* sp. y *Pseudomonas* sp. entre otros. En las últimas décadas, *C. jejuni* es considerado el principal agente causal de gastroenteritis bacteriana en el mundo, principalmente en los países industrializados (Tauxe, 1992; CPHLS, 1999).

Se ha determinado que algunos factores de virulencia que posee *C. jejuni* tales como flagelos, cápsula y toxinas le confieren la capacidad de infectar líneas celulares *in vitro* y a animales *in vivo* (Ketley, 1997; van Vliet y Ketley, 2001; Friis *et al.*, 2005). Los antibióticos de primera elección utilizados para tratar una infección causada por *Campylobacter* sp. han sido la eritromicina y la ciprofloxacina, sin embargo, a la fecha se han reportado varias cepas resistentes a estos antimicrobianos (Taylor y Tracz, 2005). Carvalho *et al.* (2008) proponen la aplicación de una terapia con bacteriófagos (con virus de la familia Myoviridae) como alternativa para combatir a estos patógenos. Sin embargo, aún falta mucho por entender sobre la biología del microorganismo en procesos tales como la variabilidad en la expresión de factores de virulencia.

En México hay poca información respecto a la problemática causada por *C. jejuni*, además de no existir una normativa que promueva su búsqueda e identificación. Por lo cual se hace evidente determinar su presencia e importancia en nuestro país como contaminante de alimentos y en posibles diagnósticos clínicos erróneos.

En este trabajo se estudió la presencia y expresión de varios factores de virulencia, entre ellos, la movilidad, quimiotaxis, producción de toxina distensora citoletal (CDT), actividad hemolítica y adherencia e invasión celular, en cepas nativas de *Campylobacter*; con el fin de determinar las características de las cepas nativas que se encuentran en alimentos, aves, cerdos y humanos en nuestro país.

3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Estudios previos demuestran la variabilidad fenotípica y genotípica en las cepas de *C. jejuni* y *C. coli* para expresar sus factores de virulencia. Esta variabilidad es influenciada por las condiciones ambientales y por la presencia o ausencia de plásmidos. La mayoría de las investigaciones se han realizado en *C. jejuni*, teniendo como consecuencia, poco conocimiento sobre otras cepas del género como lo es *C. coli*. Además, se sabe que geográficamente existen diferencias en la incidencia de cepas con diferentes niveles de virulencia y de hospederos susceptibles (Ketley, 1997; van Vliet y Ketley, 2001).

Tomando en cuenta que en México no existe información suficiente que muestre la incidencia de estos patógenos en el país, la información generada en este trabajo, en base a un análisis integral de los factores de virulencia a estudiar en cepas nativas de *C. jejuni* y *C. coli* ayudará a identificar el potencial de virulencia de las cepas que circulan en nuestro medio y generar información que permitirá diseñar medidas de prevención y control eficaces de estos microorganismos y de las enfermedades que pueden ocasionar. Así mismo, con este trabajo pretendemos promover y evidenciar la importancia de *Campylobacter* sp. en nuestra región y en el país.

4. HIPÓTESIS

Las cepas nativas de *C. jejuni* y *C. coli* presentes en nuestro ambiente poseen los siguientes factores de virulencia: movilidad, quimiotaxis, toxina distensora citoletal, actividad hemolítica y adherencia e invasión a líneas celulares.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la producción de los factores de virulencia tales como la producción de hemolisinas, quimiotaxis, movilidad, toxina distensora citoletal y adherencia e invasión a líneas celulares, de cepas nativas de *C. jejuni* y *C. coli* aisladas en Monterrey y su área metropolitana.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el grado de movilidad que poseen las cepas de *C. jejuni* y *C. coli*.
2. Caracterizar el comportamiento quimiotáctico de las cepas en base a atrayentes y repelentes.
3. Determinar la actividad hemolítica de *C. jejuni* y de *C. coli*.
4. Determinar el grado de adherencia e invasión celular de *C. jejuni* y de *C. coli* utilizando como modelo la línea celular Vero.
5. Determinar la citotoxicidad de la CDT de las cepas de *C. jejuni* y de *C. coli* utilizando como modelo la línea celular Vero.

6. ANTECEDENTES

6.1 *Campylobacter* sp.

Campylobacter jejuni y especies relacionadas (especialmente *C. coli*) son considerados patógenos de gran importancia para el hombre a nivel mundial. Una de las características más importantes y aún poco entendida para los investigadores es su cualidad de inocuo en algunos animales como las aves, en donde se encuentra como parte de la flora normal (Ketley, 1997; van Vliet y Ketley, 2001). Se le considera la causa más común de gastroenteritis bacteriana humana en países industrializados (Tauxe, 1992; Altekruse *et al.*, 1999; CPHLS, 1999), en donde la enfermedad se presenta de manera estacional atacando principalmente a adultos jóvenes y niños. También se encuentra asociada a complicaciones como el síndrome de Guillain-Barré (SGB) y al síndrome Miller-Fisher (SMF), enfermedades autoinmunes que ocasionan daño neurológico, debilidad y parálisis (Nachamkin *et al.*, 1998; Whitehouse *et al.*, 1998; Shi *et al.*, 2002).

Las bacterias del género *Campylobacter* sp. son bacilos gram negativos, microaerófilos, de 0.2-0.5 x 0.5-5 µm, curvos, con un flagelo polar en uno o ambos extremos de la célula, ureasa negativo, catalasa y oxidasa positivo. No fermentan ni oxidan carbohidratos, forman cuerpos cocoides en cultivos viejos. Se pueden encontrar en órganos reproductivos, tracto intestinal y cavidad oral de diversas especies animales, incluyendo al hombre (Holt *et al.*, 1994, Madigan y Martinko, 2006). Se ha propuesto que *C. jejuni* forma tres tipos de biopelículas (biofilms) en medios líquidos, los cuales utiliza como una de sus estrategias para aumentar su supervivencia a las condiciones de estrés ambiental (Joshua *et al.*, 2006). La capacidad de *C. jejuni* para formar biopelículas está relacionada con la composición de los constituyentes extracelulares (cápsula y flagelos). Además, se ha reportado que *C. jejuni* produce una cápsula (Karlyshev *et al.*, 2001), hemolisinas (Pickett *et al.*, 1992; Misawa *et al.*, 1995), diferentes toxinas (Johnson y Lior, 1988), la presencia de un plásmido *pVir* (Bacon *et al.*, 2000), el uso de sideróforos externos para adquirir hierro (Baig *et al.*, 1986) y una respuesta quimiotáctica a varios compuestos como aminoácidos y ácidos orgánicos (Hugdahl *et al.*, 1988; Hazeleger *et al.*, 1998). Todos estos elementos son reconocidos como parte de sus factores de virulencia, además de la presencia de flagelos, lipopolisacáridos (LPS), lipooligosacáridos (LOS), mecanismos de defensa al estrés oxidativo y respuesta a shock por calor (Ketley, 1997; van Vliet y Ketley, 2001; Goon *et al.*, 2006).

Las cepas de *C. upsaliensis*, *C. hyointestinalis*, *C. fetus* y *C. lari*, también provocan enfermedades en el hombre. Sin embargo, *C. jejuni* y *C. coli* son las de mayor importancia debido a que estas dos especies causan la mayoría de las infecciones entéricas (Ketley, 1997). La infección que produce se conoce como campilobacteriosis y se caracteriza por dolor abdominal, fiebre, bacteremia y malestar general al inicio de la enfermedad, llegando a complicarse por la presencia de diarrea aguda, profusa y a veces con sangre. El periodo de infección, antes de que se presenten los primeros síntomas es de 1 a 7 días. Los trabajos de Ketley (1997), de van Vliet y Ketley (2001), de Bhavsar y Kapadnis (2007), y de Young *et al.* (2007) presentan un panorama general de lo que se sabe respecto a la patogénesis y factores de virulencia de *Campylobacter* sp.

6.2 Factores de Virulencia de *Campylobacter*

A continuación se resumen los estudios realizados sobre los posibles factores de virulencia o elementos implicados en el proceso de infección de *Campylobacter* sp. Los resultados de estas investigaciones demostraron que la variación fenotípica de sus factores de virulencia como son la adhesión e invasión tiene un origen genético, o en el caso de los flagelos, ésta variación es influenciada por factores ambientales. Así mismo, ellos demuestran que algunas cepas carecen de algunos factores de virulencia.

6.2.1 Tipificación

Para el estudio actual de *Campylobacter* respecto a la identificación de cepas, se cuenta con métodos de serotipificación y genotipificación (Penner y Hennessy, 1980; Frost *et al.*, 1998; Duim *et al.*, 1999; Duim *et al.*, 2000; Wassenaar y Newell, 2000; Duim *et al.*, 2001; Klena, 2001; Shi *et al.*, 2002; Schouls *et al.*, 2003; Inglis y Kalischuk, 2003; Hopkins *et al.*, 2004; Nakari *et al.*, 2005). De estos dos esquemas de tipificación, los primeros en ser empleados son los serológicos; las desventajas que presentan incluyen costos elevados, mayor tiempo de realización, relativamente baja reproducibilidad (por la variación fenotípica), gran número de cepas no tipificables por estos métodos (por la carencia de sueros adecuados para todas las cepas), necesidad de elevada producción y el control de calidad de antisueros. El método más conocido y aceptado es el esquema HS de Penner basado en antígenos termo-estables usando hemaglutinación pasiva.

Los métodos de genotipificación, a diferencia de los anteriores, presentan costos y tiempo menores, mayor poder discriminatorio, alta repetibilidad, mayor número de cepas tipificables y potencial de ser universalmente disponibles (Penner y Hennessy, 1980; Wassenaar and Newell, 2000; Duim *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2002; Lastovica *et al.*, 2003; Nakari *et al.*, 2005). El sistema de genotipificación LG de Shi *et al.* (2002) es

considerado por sus inventores, exclusivo para *C. jejuni* y *C. coli* y comparable con el sistema de serotipificación HS de Penner. El poder discriminatorio de este sistema es mayor comparado con el sistema HS de Penner (Índice de Simpson para LG es $D = 0.872$ y para el sistema HS es $D = 0.842$) (Shi *et al.*, 2002). Los métodos más recientes para identificar a estos patógenos incluyen las técnicas de Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP) (Dium *et al.*, 2000), ADN Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD) (Carvalho *et al.*, 2001), PCR Multiplex (Cloak y Fratamico, 2002; Klena *et al.*, 2004), Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE) (Nadeau *et al.*, 2003), microarreglos (Pearson *et al.*, 2003; Taboada *et al.*, 2007; Malik-Kale *et al.*, 2008) y ensayos de amplificación isothermal (LAMP) (Yamazaki *et al.*, 2008). Endtz *et al.* (2000) y De Boer *et al.* (2000) evaluaron y compararon diferentes técnicas de tipificación discriminatoria, para analizar la variabilidad genética de estos patógenos y su relación con factores que afectan su incidencia. Ellos observaron que las cepas de *Campylobacter* que no pueden diferenciarse por serología, las técnicas de genotipificación pueden resolver este problema; y AFLP es un buen ejemplo de las mejores técnicas discriminatorias para tales propósitos. Además, argumentan que el poder discriminatorio de estas técnicas es superior cuando dichos análisis se realizan asistidos por computadora, y que es necesario el uso de varias técnicas para lograr una óptima tipificación de la campilobacterias.

6.2.2 Movilidad, adhesión e invasión

La movilidad, adherencia, invasión y quimiotaxis se relacionan con la presencia de flagelos y pilis, los cuáles se han reportado como factores de virulencia en diversas bacterias. En *C. jejuni* se ha demostrado la presencia de uno o dos flagelos polares, y la carencia de pilis o estructuras semejantes (Gaynor *et al.*, 2001). El conocimiento básico que se tiene de *C. jejuni* sobre los flagelos es la siguiente: su expresión está regulada a nivel transcripcional (Nuijten *et al.*, 1989); es reversible, dependiendo de las condiciones ambientales (Caldwell *et al.*, 1985); existen tres tipos de flagelinas, las proteínas FlaA, FlaB y FlaC elaboradas a partir de los genes *flaA*, *flaB* y *flaC*, respectivamente (Guerry *et al.*, 1990; Nuijten *et al.*, 1990; Song *et al.*, 2004); los flagelos están formados por FlaA y FlaB, pero FlaC es exportado de la célula a través del aparato de exportación flagelar y es importante en la invasión celular. La expresión de los genes *fla* y la glicosilación de las flagelinas son importantes para su ensamble, para la exportación extracelular de moléculas, para la interacción célula-célula (bacteria-huésped), para la adhesión e invasión, y para la respuesta inmune en el hospedero (Konkel y Joens, 1989; Everest *et al.*, 1993; Grant *et al.*, 1993; Nachamkin *et al.*, 1993; Konkel *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2004; Ketley y Konkel, 2005; Guerry *et al.*, 2006; Poly *et al.*, 2007). Hu y Kopecko (1999) y Kopecko *et al.* (2001) señalan que la internalización de *C. jejuni* en células eucariotas es dependiente de los microtúbulos.

Los estudios sobre la movilidad, adherencia, invasión celular, expresión de genes flagelares y de CDT se analizan comúnmente *in vitro* con líneas celulares animales. Las líneas celulares comúnmente utilizadas en estos estudios incluyen HEP-2, A549, HeLa, Caco-2, INT407, HT29, T84, MDCK, CHO, MRC-5, Y-1, y Vero (de Melo *et al.*, 1989; Konkel y Joens, 1990; Pickett *et al.*, 1994; Russell y Blake, 1994; Szymanski *et al.*, 1995; Ketley, 1997; Hu y Kopecko, 1999; van Vliet y Ketley, 2001; Lee *et al.*, 2003; AbuOun *et al.*, 2005; Friis *et al.*, 2005; Guerry *et al.*, 2006; Kakuda y DiRita, 2006). Algunas líneas celulares como Caco-2, HT29, T84 y MDCK forman una superficie polarizada, similar al epitelio de la mucosa de los tejidos del cual provienen; a diferencia de las líneas celulares no polarizadas (HeLa, HEP-2 y INT407), los modelos celulares polarizados son particularmente útiles para estudiar los efectos microbianos sobre la permeabilidad, el transporte y la invasión celular (Friis *et al.*, 2005).

6.2.3 Toxinas

Existe evidencia de que las cepas de *Campylobacter* sp. producen al menos seis diferentes citotoxinas: (1) citotoxina de 70 kDa activa sobre células HeLa, CHO, y otras líneas celulares pero inactivas en Vero, (2) citotoxina activa en células Vero y HeLa, (3) toxina distensora citoletal (CDT), (4) citotoxina neutralizada por antitoxina Stx, (5) citotoxinas con actividad hemolítica y (6) hepatotoxina (Wassenaar, 1997). De todas ellas las más conocidas y relacionadas con patogénesis son la enterotoxina y la CDT.

La exotoxina CDT producida por *C. jejuni* es expresada por el operón *cdtABC*. Estudios realizados sobre su estructura muestran que tiene un tamaño aproximado de 80 kDa, provoca daño celular en células eucarióticas bloqueando las fases G1 o G2 del ciclo celular (Whitehouse *et al.*, 1998, Pickett y Lee, 2005). Su efecto se puede apreciar por un aumento en los niveles de AMPc, distensión de las células afectadas y su posterior muerte celular. Los productos de estos tres genes adyacentes forman una holotoxina, cuyo modelo de acción en células sensibles indica que las subunidades CdtA y CdtC interactúan con receptores de membrana y están implicadas en la internalización celular, tráfico, secreción y producción de la enfermedad; en tanto que la subunidad CdtB muestra una actividad de DNAasa la cual provoca arresto del ciclo celular. Existe evidencia que la holotoxina al estar en contacto con el sistema inmune, afecta la función de las células T, suprimiendo su proliferación e induciendo apoptosis (Pickett y Lee, 2005). Liu *et al.* (2007) sugirieron que un gen cuyo producto estimula la producción de toxinas RTX (familia de citolisinas producidas por bacterias gram negativas formadoras de poros que requieren Ca^{2+} para ser activas) está presente en el genoma de *C. jejuni*, y cuya función especificada es actuar como factor tóxico para activar la CDT. Existe evidencia de que las cepas de *C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus*, *C. upsaliensis*, *C. lari* y *C. hyointestinalis* contienen los genes para la expresión de la CDT (Eyigor *et al.*, 1999a,b; Bang *et al.*, 2001; Bang *et al.*, 2003; Pickett y Lee, 2005).

Además de la CDT, las cepas de *Campylobacter* producen enterotoxinas tipo cólera. Ruíz-Palacios *et al.* en 1983 mostraron la primera evidencia de la producción de una enterotoxina por *C. jejuni*, a la cual se le conoció como CJT, CYTON, CTON o CCT (Wassenaar, 1997). Al estar en contacto *in vitro* con líneas celulares como CHO o Y-1, producen un aumento en los niveles de AMPc y elongación celular, además muestran una similitud inmunológica a las toxinas de *V. cholerae* (CT) y de *E. coli* (LT) (Wassenaar, 1997). Al igual que la producción de la CDT y de otros factores de virulencia de *Campylobacter*, existe variación entre las cepas en su capacidad para expresar la enterotoxina (Nuijten *et al.*, 1989; Wassenaar, 1997; Whitehouse *et al.*, 1998; Eyigor *et al.*, 1999a,b; Bacon *et al.*, 2000; Bacon *et al.*, 2001; AbuOun *et al.*, 2005).

Por mucho tiempo se consideró que *C. jejuni* no produce hemolisinas. La primer evidencia de esta actividad hemolítica en *Campylobacter* spp. es presentada por Fricker *et al.* en 1985, utilizando una técnica en tubo con eritrocitos de caballo. Posteriormente, McCardell *et al.* en 1986 identificaron algunas citotoxinas con efecto hemolítico. Arimi *et al.* (1990) evaluaron un total de 152 cepas, de las cuales el 92.3% de las cepas de *C. jejuni* y el 21.7% de *C. coli* mostraron ésta actividad en un medio en placa. Hossain *et al.* en 1993 también identificaron un efecto lítico de *C. jejuni* sobre eritrocitos, remarcando la diferencia entre dos tipos de hemólisis. Pickett *et al.* (1992) lograron demostrar la producción de estas moléculas al utilizar eritrocitos de oveja como modelo. Tay *et al.* (1995) utilizaron un ensayo en microplaca y demostraron que la identificación de la hemólisis es más eficiente en agarosa que en placas Petri con agar y sangre; sugieren que las hemolisinas están presentes en la pared celular de las campilobacterias. Misawa *et al.* (1995) demostraron que *C. jejuni* es capaz de producir α -hemólisis en concentraciones elevadas de CO₂ y β -hemólisis después de una incubación prolongada en medios suplementados con sangre. A la fecha se han identificado dos proteínas con actividad hemolítica: una lipoproteína CeuE (gen *ceuE*) componente del sistema de obtención de enteroquelina como posible hemolisina en *C. jejuni* (Park y Richardson, 1995; Richardson y Park, 1995); y en *C. coli* una fosfolipasa A (PldA) presente en la membrana externa como principal determinante hemolítico (Grant *et al.*, 1997). Un gen homólogo de *pldA* se ha identificado en el genoma de *C. jejuni* NCTC 11168 (Cj1351) (Parkhill *et al.*, 2000; Ketley y Konkel, 2005). Estas hemolisinas pueden ser considerados factores de virulencia de *C. coli* y *C. jejuni*.

Respecto a otras toxinas que se han identificado en *Campylobacter*, tales como la hepatoxina y la toxina tipo shiga, no se tiene mucha información. De estas toxinas existen algunos reportes contradictorios de su efecto y propiedades. Los resultados publicados a la fecha indican que tales incongruencias se deben a que en cada protocolo se utilizan distintas cepas bacterianas y líneas celulares (Wassenaar, 1997).

6.2.4 Quimiotaxis

La quimiotaxis se define como la capacidad de detectar y moverse a favor o en contra de gradientes químicos. El desplazamiento bacteriano no es un evento al azar sino guiado por quimiotaxis y relacionado con la movilidad flagelar, ocasionado por una atracción o repulsión de sustancias químicas, permitiendo a las células desplazarse a condiciones más favorables en su entorno. Este fenómeno ha sido ampliamente estudiado en *E. coli* y *Salmonella* (Lux y Shi, 2004). La colonización del intestino por *Campylobacter* requiere la capacidad de moverse a través de la barrera mucosa para llegar hasta las células epiteliales (Ketley, 1997; van Vliet y Ketley, 2001). La quimiotaxis es regulada por genes llamados *che* y se ha establecido que es un factor de virulencia de las campilobacterias (Paster y Gibbons, 1986; Yao *et al.*, 1997; Ketley y Konkel, 2005). En *C. jejuni* se ha establecido que la quimiotaxis está involucrada en la adhesión e invasión de células epiteliales del intestino de roedores (Yao *et al.*, 1997).

Hugdahl *et al.* (1988), Hazeleger *et al.* (1998), y Paster y Gibbons (1986) estudiaron el comportamiento quimiotáctico de *Campylobacter* como respuesta a gradientes de diferentes agentes químicos tales como aminoácidos, ácidos orgánicos, carbohidratos y sales orgánicas e inorgánicas. Utilizando diversos compuestos para simular las condiciones del intestino, Hugdahl *et al.* (1988) mostraron que algunos de los constituyentes de las sales biliares actúan como quimio-repelentes; a diferencia de compuestos como la L-fucosa, el L-aspartato, la L-cisteína y otros aminoácidos que tienen un efecto quimio-atrayente. Hazeleger *et al.* (1998) observaron que la temperatura influye sobre la quimiotaxis y la aerotaxis de estas bacterias, indicando con esto que *C. jejuni* es capaz de desplazarse a condiciones ambientales más favorables para su supervivencia en respuesta a gradientes químicos y físicos. La información que presentan estos investigadores es en base a los resultados obtenidos con cuatro cepas de *C. jejuni* (104, ATCC 33560, 74C y 108C), por lo que se requiere analizar un mayor número de cepas para conocer mejor este factor de virulencia. Paster y Gibbons (1986) analizaron las cepas de *C. concisus* 288, *C. concisus* 484, *C. fetus* subsp. *jejuni* VPI H641 y *C. fetus* subsp. *intestinalis* VPI 1176, encontrando que la quimiotaxis de estas bacterias está influenciada por la temperatura, además de la concentración y tipo de compuesto químico presente en el medio, pero la movilidad no se ve afectada. Los compuestos que tienen un efecto en la quimiotaxis de *C. jejuni* son diferentes a los reportados en *C. concisus* o *C. fetus*.

6.2.5 Cápsula

La posible existencia de una cápsula en *C. jejuni* fue inicialmente sugerido por Chart *et al.* (1996). La evidencia genética y bioquímica de la producción de un polisacárido capsular (CPS) fue presentada por Karlyshev *et al.* (2000), un año después estos mismos autores demostraron la presencia de una cápsula en células bacilares y

cocoides de *C. jejuni* por medio de microscopía electrónica (Karlyshev *et al.*, 2001). La detección de la cápsula en este microorganismo, por técnicas de tinción tradicional es ineficaz. Al respecto, Bacon *et al.* (2001) estudiaron la producción de estructuras tipo glicano (cápsula) en esta bacteria, mostrando evidencia del aumento del nivel de invasión en células INT407 por la presencia de dicha estructura. El esquema HS de Penner (Penner y Hennessy, 1980) para detectar la cápsula y componentes asociados (LPS, LOS), es de los más utilizados, sin embargo, algunas cepas no interaccionan con los antisueros y otras no son tipificables (Karlyshev y Wren, 2001; Shi *et al.*, 2002).

6.2.6 Hierro

El hierro es un componente importante pero no esencial para el crecimiento *in vitro* de *C. jejuni*. Se desconoce si produce sideróforos propios, sin embargo, por los estudios realizados para conocer el efecto de este compuesto, se sabe que puede usar sideróforos externos producidos por otros microorganismos tales como *E. coli*, *Rhodotorula pilimanae* y *Ustilago sphaerogena*. Esto le permite obtener y utilizar hierro por medio del complejo Fur (ferric uptake regulator) (Baig *et al.*, 1986; Wooldridge *et al.*, 1994; Van Vliet *et al.*, 1998; Palyada *et al.*, 2004; Ridley *et al.*, 2006). Desde que Nuijten *et al.* (1990) y Parkhill *et al.* (2000) dieron a conocer el mapa físico del genoma de las cepas *C. jejuni* 81116 y *C. jejuni* NCTC 11168, respectivamente, se han pronosticado genes y se han identificado proteínas que tienen homología con sideróforos (Park y Richardson, 1995) y con otros factores de virulencia (Pearson *et al.*, 2003; Gaynor *et al.*, 2004; Ashgar *et al.* 2007).

Estudios recientes han demostrado la participación del hierro en la respuesta al estrés causado por el peróxido de hidrógeno al unirse a proteínas Dps (proteínas de unión a DNA) (Ishikawa *et al.*, 2003) o asociado a la utilización de hemoglobina (Ridley *et al.*, 2006). Purdy *et al.* (1999) sugirieron que los efectos del hierro en presencia de peróxido de hidrógeno pueden estar involucrados directamente en el sistema superóxido dismutasa (SOD) de *C. jejuni* y *C. coli*. Ishikawa *et al.* (2003) demostraron que el hierro se une a las proteínas Dps y que esta unión le confiere a *C. jejuni* resistencia al estrés provocado por el peróxido de hidrógeno.

En 1992, Pickett *et al.* mostraron la carencia de relación entre la producción de hemolisinas y la obtención de hierro como factores de virulencia. En el 2004, Palyada *et al.* demostraron el efecto que produce la deficiencia de hierro sobre la expresión de 647 genes de *C. jejuni*, y como consecuencia el aumento del nivel de glicosilación de proteínas (la cual afecta a los flagelos), disminución de la invasión del tracto gastrointestinal, reducción en la obtención de hierro y efectos sobre la defensa de estrés oxidativo al estar como factor limitante en el medio. Indicando con estos efectos que el nivel de hierro disponible afecta el nivel de virulencia de *C. jejuni*.

6.2.7 Plásmido *pVir*

En relación a los plásmidos presentes en *Campylobacter*, se han realizado los siguientes estudios: Taylor *et al.* (1981) estudiaron la resistencia a la tetraciclina en aislados clínicos de *C. jejuni*, demostrando que la resistencia a este antibiótico se debía a la presencia de plásmidos transmisibles. Bradbury *et al.* (1983) presentaron un método rápido para examinar la presencia de plásmidos en *C. jejuni* y *C. coli*, sugiriendo su uso en epidemiología y como alternativa para caracterizar cepas no serotificables. Wang y Taylor (1990) demostraron la transformación natural de cepas de *C. coli* y de *C. jejuni*.

Bacon *et al.* (2000) presentaron la primera evidencia de un plásmido (*pVir*) en *C. jejuni* 81-176 con capacidad de virulencia al mutar los genes *comB3* y *virB11*, obteniendo cepas mutantes con una reducida capacidad de adhesión e invasión utilizando células INT407 (de intestino de humano) y animales (hurones) como modelos de estudio. Además, observaron una disminución en la frecuencia de transformación natural, comparada con cepas silvestres. Sin embargo, estudios recientes han demostrado la baja incidencia de *pVir*, además de la escasa o nula relación de la presencia del plásmido con diarrea sanguinolenta en enteritis causada por *C. jejuni* (Tracz *et al.*, 2005; Louwen *et al.*, 2006).

Considerando estos antecedentes, se hace evidente que la mayoría de la información generada acerca de los factores de virulencia es en referencia a *C. jejuni*, en comparación con los estudios realizados con *C. coli*. Debido a la importancia actual de estos dos patógenos en el área de microbiología sanitaria, en este trabajo se estudiaron seis factores de virulencia de ambas bacterias en cepas nativas de la región y cepas de referencia a fin de tratar de establecer si existen patrones específicos.

6.3 *Campylobacter* en México

Para México, a la fecha se ha reportado lo siguiente. Ruiz-Palacios *et al.* (1981) evaluaron los efectos de la campilobacteriosis, usando aves de corral como modelo experimental. Encontraron que noventa células bacterianas son suficientes para causar diarrea en el 90% de los animales infectados, quienes presentaron adicionalmente una pérdida de peso considerable y un 32% de mortalidad. Lindholm *et al.* (1989) colectaron cepas de campilobacterias en diferentes países, incluyendo a México y al analizarlas reportaron que *C. jejuni* es más frecuente, más enterotoxigénica y posiblemente más virulenta que *C. coli* y *C. lari*; Ruiz-Palacios *et al.* (1990) reportaron el efecto protector de anticuerpos presentes en la leche humana en infantes durante su lactancia contra la diarrea causada por *Campylobacter*. Oberhelman y Taylor (2000) presentaron una compilación respecto a la incidencia de enteropatógenos y sus factores asociados en países en vías de desarrollo, en donde mostraron que la incidencia de *Campylobacter* es considerablemente más alta que *Salmonella* o *Shigella*, especialmente en niños menores

de 5 años. González *et al.* (2006) reportaron un estudio epidemiológico del síndrome de Guillain-Barré (SGB) y sus posibles factores de riesgo. Sus resultados indicaron que el factor de riesgo más importante de padecer una neuropatía como la parálisis facial aguda (PFA) son las enfermedades infecciosas previas a la parálisis en un 77% de los casos con SGB. En todos los casos de SGB con previas enfermedades infecciosas, *Campylobacter jejuni* es el patógeno de mayor incidencia con un 21.7%.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas bacterianas analizadas se muestran en la tabla I. Todas las cepas nativas fueron aisladas en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos (FCB-UANL) a partir de muestras de animales o heces de humanos. Los microorganismos estuvieron almacenados en Caldo Infusión Cerebro Corazón (ICC, Bioxon) adicionado con 0.6% de extracto de levadura (EL, Bioxon) y 20% de glicerol a -80°C. Las cepas se activaron inoculando una alícuota en ICC con 0.6% extracto de levadura e incubándose a 42°C/48h en microaerofilia (10% CO₂, 5% O₂ y 85% N₂). Posteriormente, fueron resembradas en Agar Mueller-Hinton (AMH, Difco), Agar Mueller-Hinton suplementado con 5% sangre lisada (AMHS), Agar Mueller-Hinton y Agar Brucella (AB, Difco) suplementados con 5% sangre no lisada (AMHSN y ABSN, respectivamente), o en agar blando (caldo Mueller-Hinton con 0.4% agar (AB/MH)), dependiendo del ensayo realizado.

A partir de la resiembra de la cepa activada, se prepararon suspensiones celulares de 10⁸ UFC/ml en solución salina estéril al 0.85% (SS) o en solución amortiguadora salina de fosfatos (PBS) para cada tratamiento. Todas las cepas se confirmaron por PCR-Multiplex específico para diferenciar entre *C. coli* y *C. jejuni*, tal y como se describe más adelante.

Tabla I
Cepas de *Campylobacter* utilizadas

Cepas de referencia utilizadas					
Cepa	Origen	Fuente			
C. jejuni 5653	Cerdo	Animal Disease Center of USDA (Ames Iowa, EUA)			
C. jejuni 50 sp	Humano (sano)	Instituto Nacional de Salud Pública y Nutrición “Salvador Zubirán” (México, D.F.)			
C. jejuni 57 sp	Humano (sano)				
C. jejuni 193 ip	Humano (diarrea)				
C. jejuni 180 ip	Humano (diarrea)				
C. jejuni 238 ip	Humano (diarrea)				
C. jejuni 173 ip	Humano (diarrea)				
Cepas de C. jejuni y C. coli aisladas en Monterrev y su área metropolitana					
Cepa identificada	Id. de aislado	Origen	Cepa identificada	Id. de aislado	Origen
C. coli	1	Ave	C. coli	61PVT	Pollo
C. coli	48	Pollo	C. coli	67PVB	Pollo
C. coli	60	Cerdo	C. coli	68PVB	Pollo
C. coli	81	Guajolote	C. jejuni	35PVB	Pollo
C. coli	90	Pollo	C. jejuni	31PVB	Pollo
C. coli	100	Ave	C. jejuni	101	Ave
C. coli	062F	Pollo	C. jejuni	102	Gallina
C. coli	066F	Pollo	C. jejuni	27PFF	Pollo
C. coli	074F	Pollo	C. jejuni	009B	Pollo
C. coli	054B	Pollo	C. jejuni	034B	Pollo
C. coli	M424	Muestra de alimento	C. jejuni	060B	Pollo
C. coli	30PFB	Pollo	C. jejuni	37	Ave
C. coli	BCO48h	Pollo			

7.2 PCR Multiplex

Cada cepa de *C. coli* y *C. jejuni* fue confirmada por la técnica de PCR-Multiplex descrita por Cloak y Fratamico en el 2002. Este procedimiento fue capaz de discriminar entre *C. coli* y *C. jejuni*, lo cual se logró utilizando primers para amplificar genes específicos de estas dos cepas.

A partir de un inóculo bacteriano cultivado en ICC+EL durante 48h a 42°C, se tomó una alícuota de 1ml, se centrifugó a 14000g por 8 min. El sobrenadante se decantó, el precipitado celular se lavó dos veces con SS y se resuspendió en 100 µl de SS. Se calentó en Baño María hasta ebullición por 20 min., se centrifugó nuevamente y se tomó una alícuota de 5 µl del sobrenadante para la reacción de amplificación.

Las reacciones de amplificación se realizaron en volúmenes de 50 µl conteniendo 5 µl de la muestra de ADN, 10 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM de cada uno de los cuatro deoxinucleótidos trifosfato, 0.40 µM de cada primer (cadF2B, cadR1B, COL 1, COL 2, C-1 y C-2 (Bioline)) y 1.25 U of Taq DNA polimerasa (Bioline). Las características de los primers empleados y los genes que amplifican se muestran en la tabla II. Las muestras tuvieron una desnaturalización inicial a 94°C/4min., seguida por 30 ciclos de amplificación a 94°C/1min., 52°C/1min., 72°C/1min. y una extensión final a 72°C/5min. en un termociclador (ThermoHybaid). Los productos de la reacción se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% (Gibco-BRL) y subsecuentemente teñidos con bromuro de etidio.

Tabla II

Primers empleados para la PCR-Multiplex de *C. jejuni* y *C. coli*

Cepa Blanco	Talla del producto (pb)	Primer (<i>gen</i>)	Secuencia (5'-3')
<i>C. coli</i> / <i>C. jejuni</i>	400	cadF2B (<i>cadF</i>) cadR1B	TTGAAGGTAATTTAGATATG CTAATACCTAAAGTTGAAAC
<i>C. coli</i>	894	COL1 (<i>ceuE</i>) COL2	ATGAAAAAATATTTAGTTTTTGCA ATTTTATTATTTGTAGCAGCG
<i>C. jejuni</i>	159	C-1 (<i>gen no definido</i>) C-4	CAAATAAAGTTAGAGGTAGAATGT GGATAAGCACTAGCTAGCTGAT

Fuente: Cloak y Fratamico (2002).

7.3 Cultivo y mantenimiento de células Vero

La línea celular Vero (células de hígado de mono verde africano) fue cultivada en frascos para cultivo celular de 25 cm² (F25) con el Medio Mínimo Esencial Eagle de Dulbecco (DMEM, Gibco) adicionado con 3% de suero fetal bovino (SFB, Gibco) y 1% de L-glutamina, y se mantuvieron en cultivo con una atmósfera de 5% CO₂ a 37°C. Para los ensayos de adherencia, invasión y citotoxicidad, las células Vero confluentes en

Guadalupe Ismael Malagón Santiago

monocapa fueron cosechadas utilizando tripsina (0.25% p/v de tripsina / 0.2% de EDTA, a 37°C) y lavadas una vez con DMEM. Posteriormente, las células se subcultivaron en el medio DMEM hasta confluencia en placas de cultivo de tejido de 96 ó 12 pozos (Corning) (Ausubel *et al.*, 2002). Antes de realizar los ensayos, se evaluó la viabilidad celular utilizando bromuro de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolio (MTT, Sigma) al 0.5% en PBS (Coote y Arain, 1996).

7.4 Ensayos de movilidad

Para detectar el grado de movilidad de las cepas de *C. jejuni* y *C. coli*, se utilizó la técnica de pozo en agar (figura 1). A partir de inóculos bacterianos en AMHS, se prepararon suspensiones bacterianas de 1.5×10^8 UFC/ml en SS y se tomaron alícuotas (70 µl/pozo) para inocular una placa de AB/MH con 5 pozos de 7 mm de diámetro, distribuidos uniformemente. Al medio AB/MH se le agregaron 5 ml/L de cloruro de trifenil tetrazolio al 1% (CTT, Sigma), antes de ser vertido en las placas Petri. Las cepas *C. jejuni* 5653 y *C. jejuni* 180ip se utilizaron como control positivo (cepa móvil) y control negativo (cepa inmóvil), respectivamente. Se utilizó SS como blanco. Las placas se incubaron por 24h/42°C en microaerofilia y después el diámetro de los halos de migración fue medido en milímetros. Los ensayos se realizaron por triplicado.

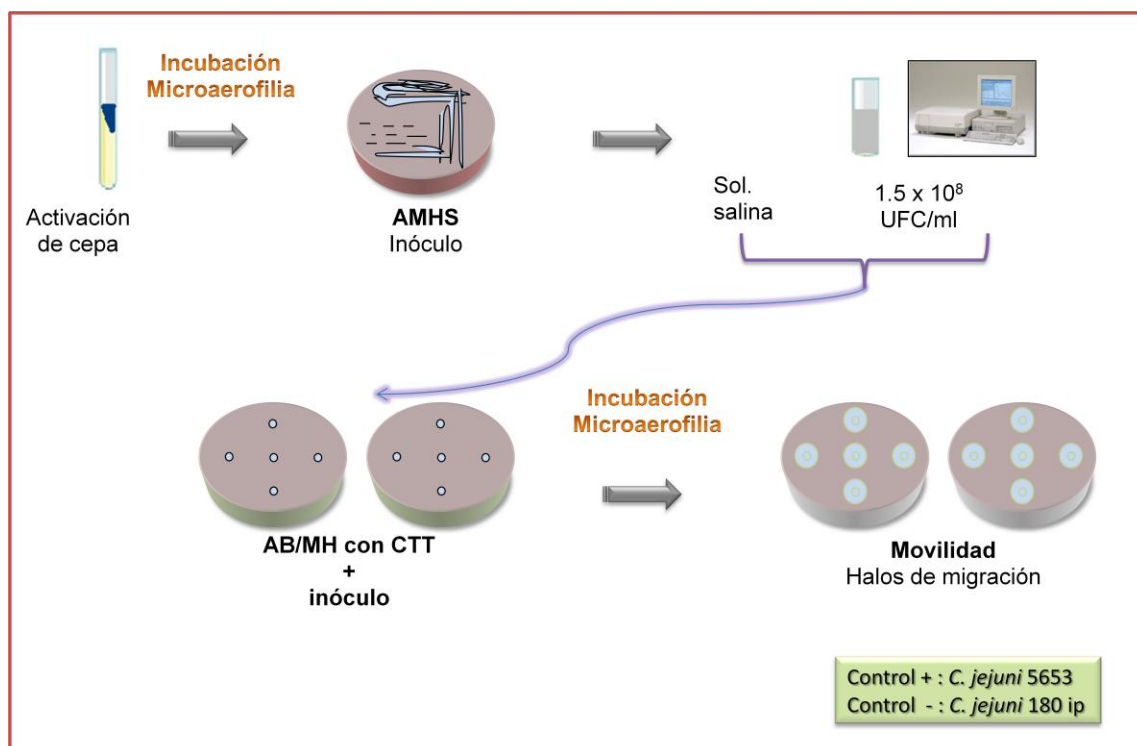


Figura 1. Ensayo de Movilidad

7.5 Ensayos de Quimiotaxis

Para evaluar la quimiotaxis, se utilizó el método HAP (hard-agar plug) descrito por Hugdahl *et al.* (1988) y Hazeleger *et al.* (1998). Los agentes quimiotácticos (AQ's, Sigma) utilizados fueron: L-ácido aspártico, L-cisteína hidrociorada, L-glutamato monosódico, citrato de sodio, ácido cólico, ácido taurocólico, ácido quenodeoxicólico, ácido deoxicólico y L-serina; cada uno a una concentración de 0.1M a pH 7.0 en PBS. El L-glutamato monosódico, el ácido cólico y PBS se utilizaron como control positivo (atrayente), control negativo (repelente) y blanco, respectivamente. Estos compuestos se prepararon a doble concentración y se esterilizaron con membranas de nitrocelulosa de 0.22 μm de diámetro. Después se diluyeron adicionando 10 ml de cada sustancia en 10 ml de una solución de agar (PBS + 3% agar, estéril) a 70°C, se mezclaron y se colocaron en cajas Petri. Se permitió solidificar a temperatura ambiente una noche y se cortaron trozos cilíndricos de agar de 7 mm de diámetro (HAPs). De cada cepa cultivada en AMHS a 42°C/48h, se prepararon suspensiones bacterianas de 10 ml con 9×10^8 UFC/ml en PBS (pH 7.0). Cada suspensión se mezcló con 10 ml de PBS + 0.8% de agar a 50°C. Las mezclas se colocaron en una caja Petri, la densidad final de cada cepa fue de 4.5×10^8 UFC/ml. Las células bacterianas estaban distribuidas uniformemente en el agar blando. Inmediatamente, los HAPs de cada AQ fueron colocados en el agar blando (cinco HAPs diferentes por placa). El agar se dejó solidificar y posteriormente las placas se incubaron durante 4h/42°C en condiciones de microaerofilia (figura 2 y tabla III). Los ensayos se realizaron por triplicado.

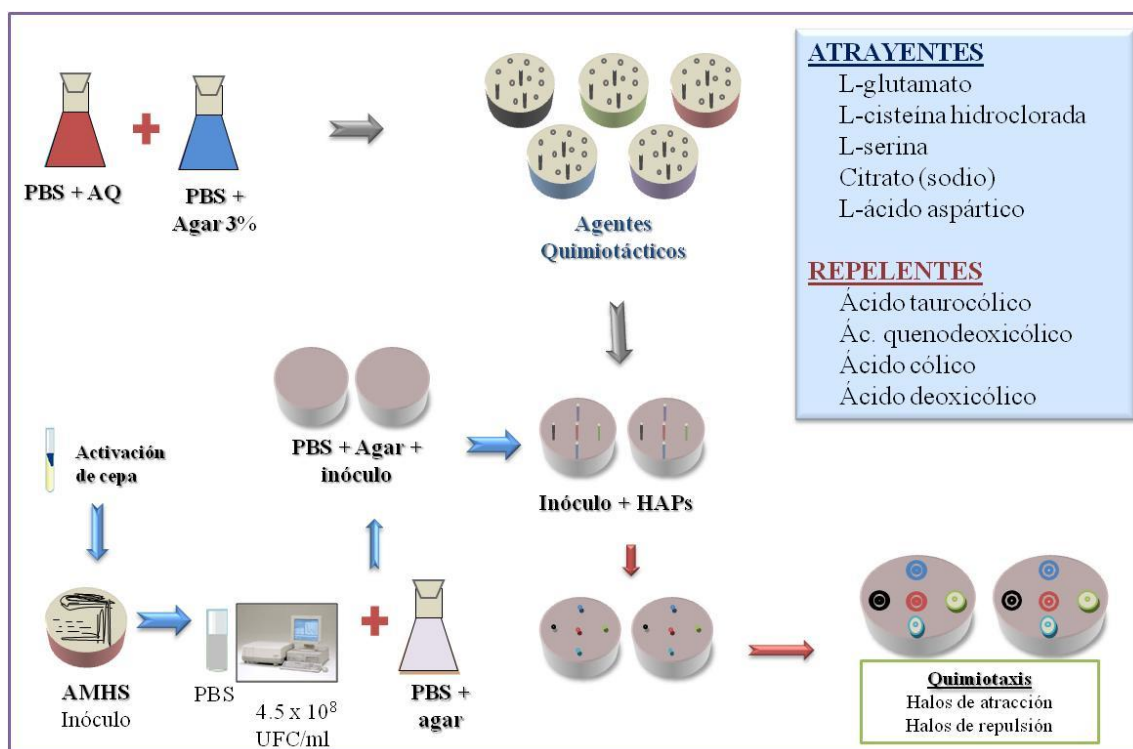


Figura 2. Ensayo de Quimiotaxis

El efecto de cada sustancia se evaluó con la formación de halos de migración de las células bacterianas alrededor de cada agente quimiotáctico. De acuerdo con los autores de esta técnica, los halos se forman por la migración de las bacterias a favor o en contra del gradiente químico: halos de atracción (quimiotaxis positiva = zona más densa y opaca alrededor del HAP), halos de repulsión (quimiotaxis negativa = zona más clara y transparente alrededor del HAP) o sin formación de halos (sin efecto quimiotáctico = zona con la misma densidad y apariencia que las zonas donde no hay HAPs).

Con el propósito de evaluar y descartar el posible efecto de inhibición o estimulación de los AQ's sobre el crecimiento de las bacterias, se realizaron los siguientes experimentos: a) Cada cepa se cultivó en AMH y se puso en contacto con los AQ's ([0.1M], en PBS a pH 7.0) durante 48h/42°C, utilizando la técnica de pozo en agar. Se agregó un AQ por cada pozo; b) Se repitieron los ensayos de quimiotaxis, en este caso los ensayos se realizaron en tubo y sin agar, poniendo en contacto en cada tubo a una cepa con un solo AQ. Al inicio y al final del ensayo se registró la lectura de Transmitancia a 600nm en un espectrofotómetro. También se sembró una alícuota de cada cepa en AMH para contabilizar el inóculo al inicio y al final del ensayo.

Tabla III
Ensayos de quimiotaxis de *C. jejuni* y *C. coli*

Agentes Quimiotácticos [0.1M], pH 7.0		Cepas Bacterianas ^{a,b}									
		A	B	C	D	E	F	G	H	...	N
ATRAYENTES	L-glutamato (monosodio)	X ₁₁	X ₁₂	X ₁₃	X ₁₄	X ₁₅	X ₁₆	X ₁₇	X ₁₈	X ₁	X _{1n}
	L-serina	X ₂₁	X ₂₂	X ₂₃	X ₂₄	X ₂₅	X ₂₆	X ₂₇	X ₂₈	X ₂	X _{2n}
	L-ácido aspártico	X ₃₁	X ₃₂	X ₃₃	X ₃₄	X ₃₅	X ₃₆	X ₃₇	X ₃₈	X ₃	X _{3n}
	Citrato (sodio)	X ₄₁	X ₄₂	X ₄₃	X ₄₄	X ₄₅	X ₄₆	X ₄₇	X ₄₈	X ₄	X _{4n}
	L-cisteína hidrociorada	X ₅₁	X ₅₂	X ₅₃	X ₅₄	X ₅₅	X ₅₆	X ₅₇	X ₅₈	X ₅	X _{5n}
REPELENTES	Ácido taurocólico	X ₆₁	X ₆₂	X ₆₃	X ₆₄	X ₆₅	X ₆₆	X ₆₇	X ₆₈	X ₆	X _{6n}
	Ácido deoxicólico	X ₇₁	X ₇₂	X ₇₃	X ₇₄	X ₇₅	X ₇₆	X ₇₇	X ₇₈	X ₇	X _{7n}
	Ácido quenodeoxicólico	X ₈₁	X ₈₂	X ₈₃	X ₈₄	X ₈₅	X ₈₆	X ₈₇	X ₈₈	X ₈	X _{8n}
	Ácido cólico	X ₉₁	X ₉₂	X ₉₃	X ₉₄	X ₉₅	X ₉₆	X ₉₇	X ₉₈	X ₉	X _{9n}

^a Variable de respuesta: + quimiotaxis positiva (halo de atracción), - quimiotaxis negativa (halo de repulsión), 0 = sin quimiotaxis. ^b X_{ij} = n-ésimo dato de la i-ésima hilera y j-ésima columna.

7.6 Ensayos de hemólisis

Para evaluar la actividad hemolítica, se utilizó el método de Misawa *et al.* (1995). A partir de un cultivo de 24h/42°C de cada cepa en AMHS, se inoculó por estría en placas de AMHSN y se incubaron en una atmósfera de 33% CO₂/35°C. Para la detección de la actividad hemolítica tipo alfa (α -HLA), las placas se incubaron por 48 h/pH 6.5. Para la detección de la actividad hemolítica tipo beta (β -HLA), las placas se incubaron por 7 d/pH 7.5. Las cepas de *S. pyogenes* ATCC 19615 y *S. sanguinis* ATCC 10556 se utilizaron como controles para detectar las hemólisis β -HLA y α -HLA, respectivamente. La actividad hemolítica se reportó en base a la observación visual de hemólisis tipo alfa, hemólisis tipo beta o ausencia de hemólisis (figura 3 y tabla IV). Los ensayos se realizaron por triplicado.

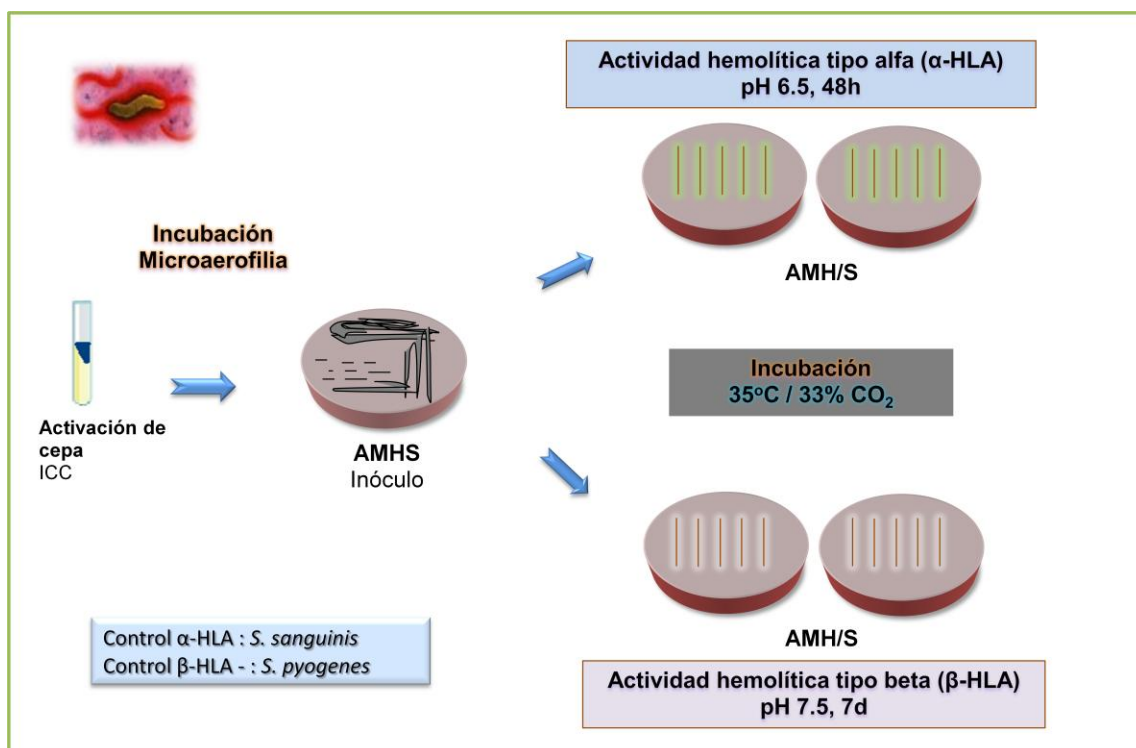


Figura 3. Ensayo de Hemólisis

Tabla IV
Actividad hemolítica de las cepas

HEMÓLISIS ^c	Cepas Bacterianas ^{a,b}							
	A	B	C	D	E	F	...	N
α -HLA	X_{11}	X_{12}	X_{13}	X_{14}	X_{15}	X_{16}	X_{1i}	X_{1n}
β -HLA	X_{21}	X_{22}	X_{23}	X_{24}	X_{25}	X_{26}	X_{2j}	X_{2n}

^a Variable de respuesta: + hemolítico, - no hemolítico. ^b X_{ij} = n -ésimo dato de la i -ésima hilera y j -ésima columna. ^c α -HLA = hemólisis tipo alfa, β -HLA = hemólisis tipo beta.

7.7 Ensayos de adherencia e invasión celular

Para realizar estos ensayos se utilizó la técnica descrita por Konkel y Joens (1989) y la de Elvers y Park (2002), con la diferencia de que en este caso se utilizó la línea celular Vero como modelo experimental. Para cada cepa, a partir de inóculos provenientes de AMHS en condiciones microaerófilas a 42°C/48h, se prepararon suspensiones bacterianas de *C. jejuni* y *C. coli* a una densidad de 1×10^8 UFC/ml en PBS; se tomaron alícuotas de 1 ml, se centrifugaron a 6000g por 10 min. y el precipitado bacteriano se resuspendió en 1 ml de DMEM. En placas de cultivo de tejidos de 96 pozos, sembradas previamente con células Vero (2×10^5 células/ml) y 150 μ l de medio DMEM (incubadas a 37°C/48h para permitir la confluencia de la monocapa), se inocularon tres pozos con 10 μ l de cada suspensión bacteriana (1×10^6 UFC por pozo). Posteriormente, las placas se incubaron por 3h para permitir la adherencia de las células bacterianas a las células Vero.

Después, los dos primeros pozos se lavaron dos veces con PBS. Al primer pozo se le agregaron 150 μ l de DMEM; al otro pozo se le agregaron 150 μ l de DMEM+250 μ g/ml de gentamicina (Sigma), a fin de matar las bacterias extracelulares. La placa de cultivo se incubó por 3h más. Después de la incubación, los dos pozos se lavaron tres veces con 200 μ l de la solución salina balanceada de Hanks (HBSS, Sigma). Al final, a los tres pozos inoculados con cada cepa se les agregó 100 μ l de Triton X-100 al 0.1% (v/v) en PBS para lisar las células Vero. El contenido de bacterias en los tres pozos se cuantificó por la técnica de vertido en placa usando AMH + CTT (utilizando diluciones decimales seriales), para obtener la cuenta viable total de células bacterianas adheridas (pozo 1), invasivas (pozo 2) e inoculadas (pozo 3), respectivamente. Se incluyó un blanco que consistió de células Vero sin bacterias (figura 4 y tabla V). Los ensayos se realizaron por triplicado.

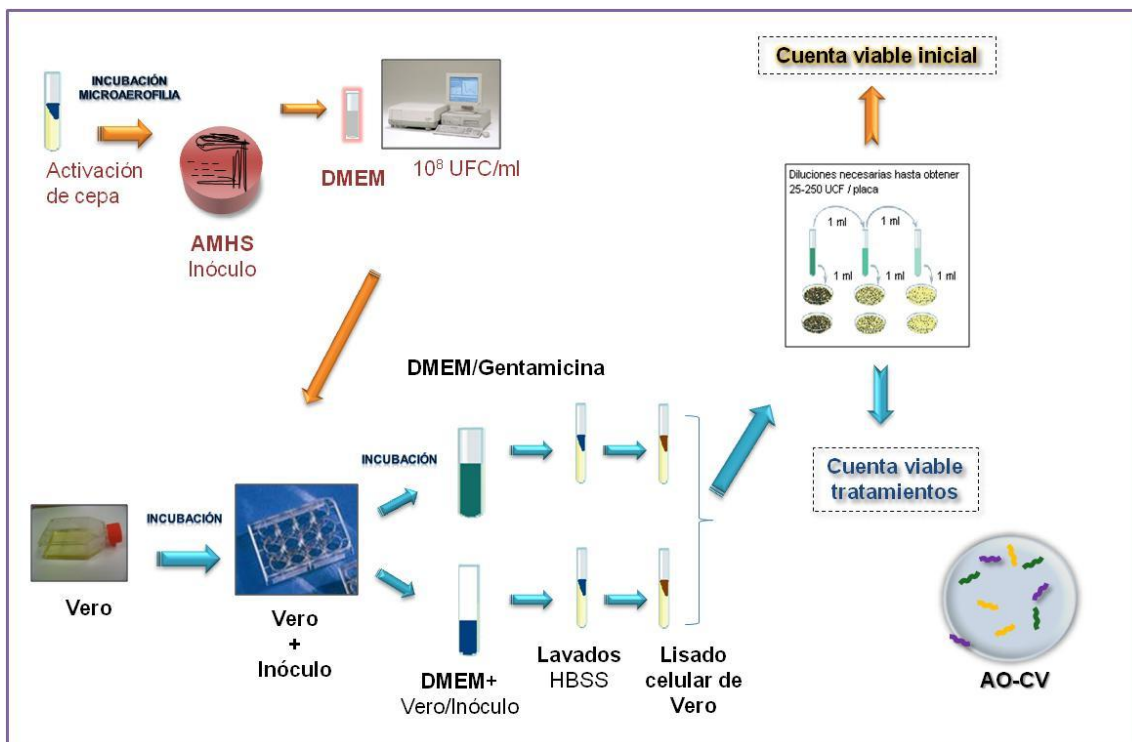


Figura 4. Ensayo de Adhesión e Invasión Celular

Tabla V

Adherencia e invasión de *C. jejuni* y *C. coli* sobre Vero

Adhesión e invasión celular		Cepas Bacterianas ^b									
		A	B	C	D	E	F	G	H	...	N
Bacterias (UFC/pozo) ^a	Inóculo Inicial	X_{11}	X_{12}	X_{13}	X_{14}	X_{15}	X_{16}	X_{17}	X_{18}	X_{1i}	X_{1n}
	Adheridas	X_{21}	X_{22}	X_{23}	X_{24}	X_{25}	X_{26}	X_{27}	X_{28}	X_{2j}	X_{2n}
	Invasivas	X_{31}	X_{32}	X_{33}	X_{34}	X_{35}	X_{36}	X_{37}	X_{38}	X_{3k}	X_{3n}

^a Valor promedio de UFC \pm SD; ^b X_{ij} = n -ésimo dato de la i -ésima hilera y j -ésima columna

7.7.1 Visualización de las bacterias invasivas por el método AO-CV

Para comprobar la presencia de las bacterias dentro de las células Vero en los ensayos de adherencia e invasión, se utilizó el método de naranja de acridina-cristal violeta (AO-CV) descrito por Hu y Kopecko (1999). Para esto se utilizaron monocapas de células Vero infectadas no tratadas con gentamicina, creciendo sobre cubreobjetos para cultivo celular (Thermanox), colocados en placas de cultivo de tejidos de 12 pozos. Las condiciones de cultivo de las células Vero y la cantidad del inóculo bacteriano,

fueron los mismos que se emplearon en los ensayos de adhesión e invasión celular. Las células fueron teñidas con naranja de acridina al 0.01% en solución Gey (Sigma) por 45s., lavadas con EBSS (solución salina balanceada de Earle con Ca^{2+} y Mg^{2+} , Sigma) y teñidas con cristal violeta al 0.5% en NaCl (Fermont) al 0.15% por 45s. Al final se lavaron con EBSS. Las preparaciones teñidas se observaron con un microscopio de epifluorescencia y la interpretación se realizó de la siguiente manera: *Verde* – bacterias viables intracelulares, *Naranja* – bacterias no viables, y *Violeta* – bacterias viables extracelulares.

7.8 Ensayos de citotoxicidad de CDT sobre células Vero

Para estos ensayos, se consideraron los trabajos de Coote y Arain (1996), Wassenaar (1997) y AbuOun *et al.* (2005); y se utilizó la línea celular Vero, incubada hasta confluencia en placas de 96 pozos, para evaluar la producción de la CDT.

a) Producción de la CDT. La producción de la CDT se realizó con dos técnicas:

Cultivo Bifásico. Para esto, la cepa fue activada en ICC+EL y resembrada en AMH por 24h a 42°C. Se obtuvo un inóculo de 1.0×10^9 UFC/ml en SS y 500 μl (5×10^8 UFC) fueron inoculados en la superficie de una placa de AMH, la cual fue incubada por 42°C/24h en microaerofilia. Después, se adicionaron 10 ml de ICC+EL sobre la superficie de la placa inoculada y se incubó nuevamente por 48h/42°C. Posteriormente, se removió la fase líquida junto con las células adheridas sobre la superficie de la placa. La fase líquida se sometió a sonicación (8 pulsos de 10watts/30s con lapsos de 10s), se centrifugó a 14000g por 10 min. y el sobrenadante se esterilizó por filtración (membranas de 0.22 μm). Finalmente, los filtrados (en donde se podría encontrar la CDT producida por cada cepa) fueron almacenados en alícuotas de 1 ml a -80°C hasta el momento de realizar los ensayos de citotoxicidad.

Polimixina B. Se siguió la técnica de Coote y Arain (1996). Para esto se activó la cepa en ICC+EL a 42°C por 48h y una alícuota fue resembrada en AMH, la cual fue incubada a 42°C por 48h. Se ajustó una suspensión celular a 1.0×10^9 UFC/ml con PBS. De esta suspensión se tomaron alícuotas de 1 ml y se centrifugaron a 14000g por 8 min. a 4°C. Los precipitados obtenidos fueron resuspendidos en 1 ml de DMEM + 0.15% de Polimixina B (Sigma) (para promover un aumento en la producción de la CDT y la enterotoxina, así como la liberación del material celular) y se incubaron a 37°C por 30 min. Después de la incubación, los tratamientos fueron centrifugados a 14000g por 8 min. a 4°C y el sobrenadante se esterilizó por filtración usando membranas de 0.22 μm . Finalmente, los filtrados fueron almacenados en alícuotas de 1 ml a -80°C hasta el momento de realizar los ensayos de citotoxicidad.

b) Ensayos de citotoxicidad

Para esto se utilizaron los filtrados congelados obtenidos por las técnicas anteriores. Se tomó un volumen de 150 µl de los filtrados bacterianos y sus diluciones (0, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 y 1:128), y se colocaron en placas de 96 pozos, las cuales contenían una suspensión de células Vero en monocapa confluyente previamente incubadas durante 24h en medio DMEM. Posterior a la adición de los filtrados, las placas fueron incubadas durante 48h a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Después, a cada pozo se le agregaron 20 µl de MTT (Sigma) al 0.5% en PBS y se incubaron 3h más. El exceso del medio fue removido y el formazan producido (MTT reducido por acción de la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial de células vivas) se solubilizó agregando 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma). Las placas fueron examinadas con un espectrofotómetro a 490nm (Microplate Reader, modelo 550) (figura 5). El efecto citotóxico de la CDT sobre la línea celular Vero se evaluó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Muerte celular} = 1 - \frac{DO \text{ pozo de prueba}}{DO \text{ pozo de control negativo}} \times 100$$

Para los ensayos de la CDT producida por cultivo bifásico, se incluyeron ICC y Verotoxina de *V. cholerae* como controles negativo y positivo, respectivamente. Para los ensayos de la CDT producida usando polimixina B, se empleó DMEM+Polimixina B y Verotoxina de *V. cholerae* como controles negativo y positivo, respectivamente. Para cuantificar el porcentaje de muerte celular, el control negativo consistió de células Vero en DMEM; el blanco consistió de DMSO exclusivamente. Los cambios morfológicos se examinaron por microscopía de contraste de fases antes de la adición del MTT. Los títulos de las toxinas fueron expresados de la siguiente manera: una unidad CDT₅₀ (unidad arbitraria) es el recíproco de la dilución más alta que causó al menos el 50 % de muerte celular por efecto de la CDT.

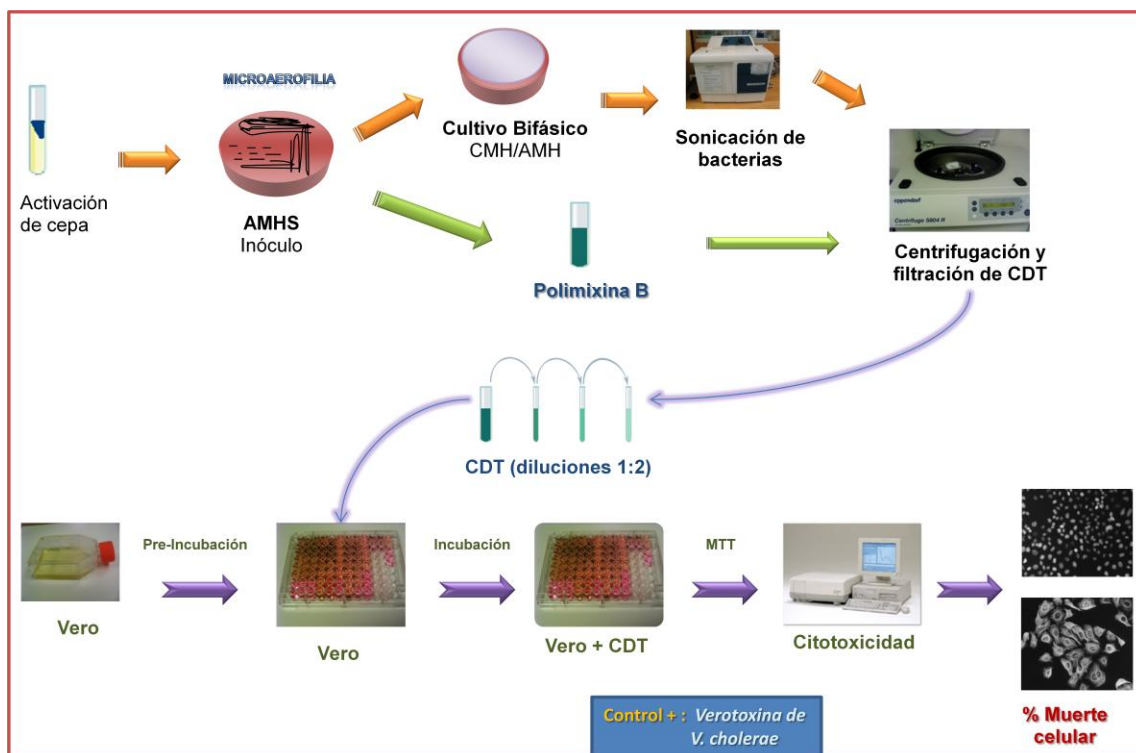


Figura 5. Ensayo de Citotoxicidad

7.9 Análisis Estadísticos

Para el análisis estadístico de cada factor de virulencia, se emplearon los programas SPSS 15.0 y NCSS 07.1.10. El diseño experimental aplicado a cada factor de virulencia se menciona en las secciones correspondientes a cada uno de ellos; las pruebas estadísticas empleadas se enlistan en la tabla VI. Además, se aplicaron tres análisis multivariantes: a) Análisis de Componentes Principales (ACP), para evaluar la virulencia de *Campylobacter* sp., considerando la influencia de cada factor de virulencia analizado; b) Escalamiento Multidimensional métrico (ASCAL), para analizar la relación dimensional entre los factores; c) Correlación Múltiple, para analizar y determinar la correlación de los parámetros estudiados (factores de virulencia). Las pruebas estadísticas se realizaron por separado para las cepas de *C. jejuni* y de *C. coli*, excepto en los análisis ACP y ASCAL.

7.9.1 Análisis de Componentes Principales

Los resultados obtenidos para cada factor de virulencia de todas las cepas, fueron utilizados para realizar este análisis. El método de extracción del análisis factorial fue por Componentes Principales, con solución de factores rotados y no rotados, y se aplicó el método de rotación Varimax.

7.9.2 Escalamiento Multidimensional (ALSCAL)

Los resultados obtenidos para cada factor de virulencia de todas las cepas, fueron utilizados para realizar este análisis multivariante, utilizando el método ALSCAL (escalamiento multidimensional métrico). Debido a que las variables (factores de virulencia) están en diferente escala, los datos se estandarizaron con valores Z para poder analizarlos. Se utilizó la medida de distancia χ^2 , el nivel de medida ordinal y un modelo de escalamiento de dos dimensiones con distancia Euclidiana.

7.9.3 Análisis de Correlación Múltiple

Los resultados obtenidos en los experimentos para cada factor de virulencia, fueron utilizados para realizar este análisis multivariante. La fuente de aislamiento de cada cepa se incluyó como variable adicional a los factores de virulencia. La correlación de las variables se evaluó aplicando el coeficiente de correlación de Pearson (ρ).

Tabla VI

Análisis estadísticos

<i>Factor de Virulencia</i>	<i>Prueba o Análisis Estadístico</i>	<i>Notas</i>
Movilidad	Kruskal-Wallis (H)	Movilidad (mm)
Quimiotaxis	Friedman (χ^2_r)	Datos codificados: +1 = atracción; -1 = repulsión; 0 = sin quimiotaxis
Hemólisis	Friedman (χ^2_r)	Datos codificados: 1 = hemolítico; 0 = no hemolítico
Adhesión e Invasión Celular	ANOVA de una vía para bloques completos	Transformación logarítmica: $x' = \log_{10} x$
Citotoxicidad	ANOVA de una vía	% Muerte Celular
TODOS	ACP	Extracción de Componentes Principales
TODOS	Escalamiento Multidimensional	ALSCAL (Modelo de escalamiento métrico)
TODOS	Correlación Múltiple	Coeficiente de Correlación de Pearson (la fuente de aislamiento de las cepas se incluyó en este análisis)

8. RESULTADOS

8.1 Tipificación de las cepas de *C. coli* y de *C. jejuni*

Un total de 32 cepas de *Campylobacter* sp. fueron analizadas en este trabajo, de las cuales 7 cepas son de referencia y las 25 cepas restantes fueron aislados nativos (tabla I). La identificación de los aislados nativos se realizó por técnicas de microbiología tradicional y se confirmaron por PCR-Multiplex antes de evaluar sus factores de virulencia (figura 6).

La técnica de PCR Multiplex de Cloak y Fratamico (2002) permitió identificar y diferenciar entre cepas de *C. jejuni* y *C. coli*. De acuerdo a estos autores, ambas bacterias comparten el gen *cadF* (banda de 400 pb), pero el gen *ceuE* (banda de 894 pb) es exclusivo de *C. coli*, mientras que un “gen no definido” (banda de 159 pb) está presente solo en *C. jejuni*. El análisis de las cepas arrojó que 16 fueron *C. jejuni* y 16 fueron *C. coli* (tabla I).

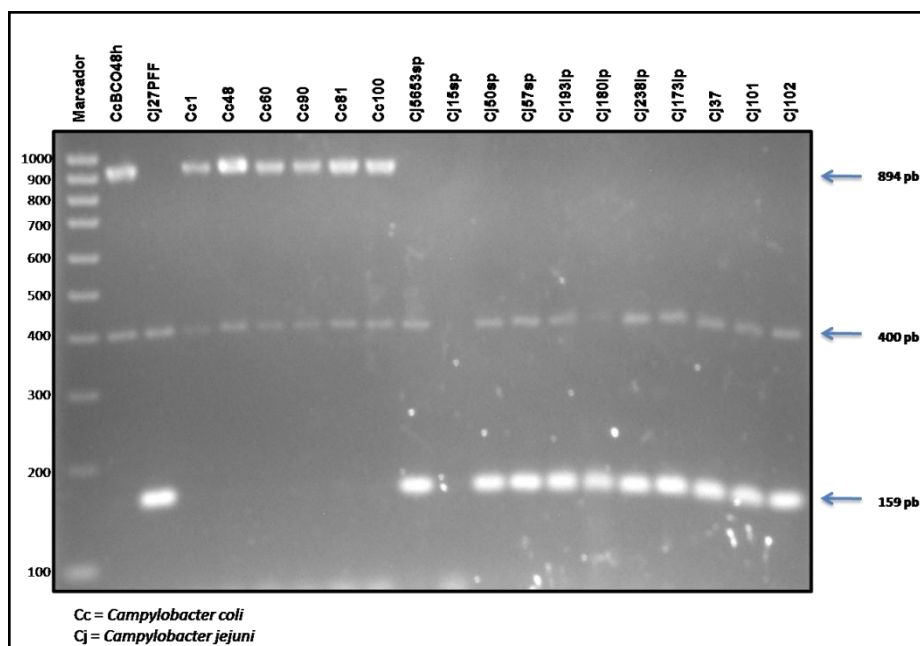


Figura 6. PCR-Multiplex para diferenciar a *C. coli* de *C. jejuni*. **Carril 1:** Marcador molecular. **Carril 2:** Cepa Cc BCO48h como control para identificar las cepas de *C. coli*. **Carril 3:** Cepa Cj 27PFF como control para identificar las cepas de *C. jejuni*. **Carriles 4-9:** cepas de *C. coli*. **Carriles 10-19:** cepas de *C. jejuni*.

8.2 Movilidad

De las siete cepas de referencia y de las 25 cepas nativas, se detectó movilidad en nueve cepas de *C. jejuni* y en ocho cepas de *C. coli* en las condiciones evaluadas. Las cepas restantes no mostraron movilidad. Estos datos se presentan en la tabla VII y en la gráfica 1. En la figura 7 se muestra visualmente el resultado de los ensayos en cuatro cepas con diferente grado de movilidad; se pueden observar halos de color rojo en el agar alrededor de los pozos inoculados con las bacterias. El color rojo es resultado de la transformación bacteriana del CTT a formazan, presente en el medio de cultivo. En los casos donde se observó el formazan en los pozos pero no en el agar alrededor de los mismos, se consideraron cepas no móviles. La cepa Cj 37 fue la de mayor movilidad en las condiciones evaluadas; las cepas Cj 35PVB y Cc 67PVB fueron las que presentaron mayor variación. De las 17 cepas móviles, la mayoría de éstas formaron halos entre 2 y 13 mm de diámetro.

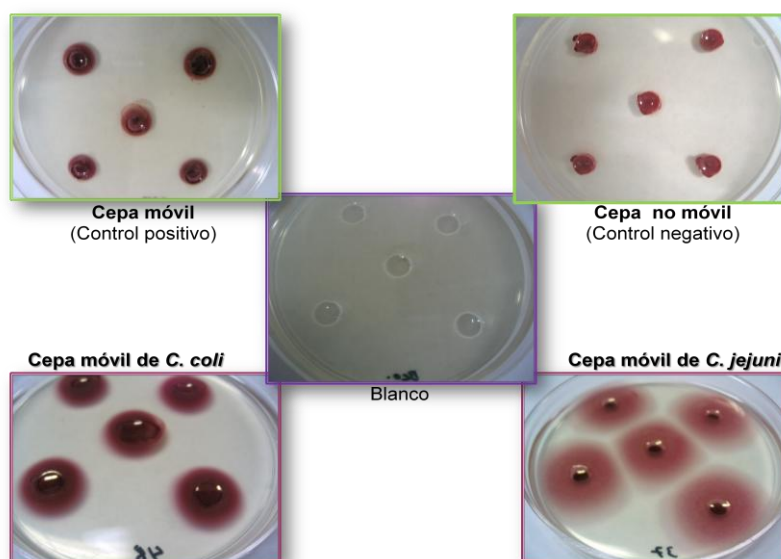


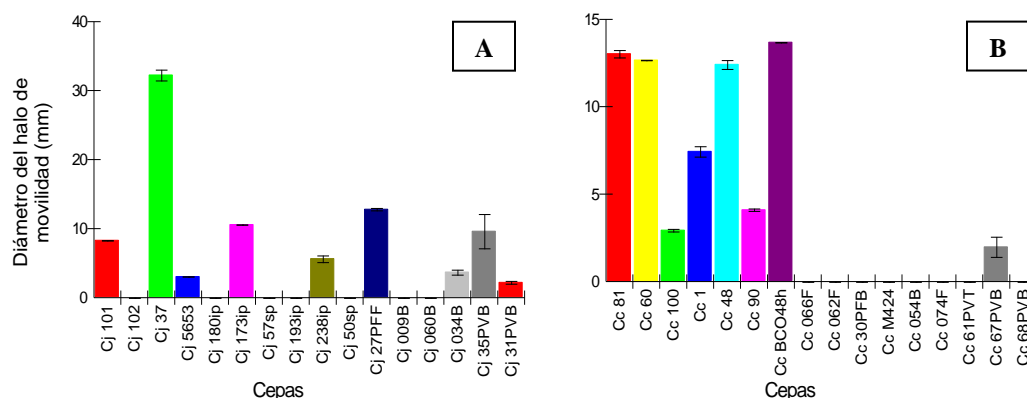
Figura 7. Movilidad de las cepas en medio de cultivo semisólido con TTC. Se muestran tres cepas móviles, una cepa no móvil y un blanco (SS). La coloración roja en los pozos y los halos se debe al TTC reducido a formazan por acción enzimática bacteriana. **Cepa móvil:** cepa capaz de desplazarse en el medio semisólido desde el pozo, identificada por los halos de color rojo. **Cepa no móvil:** cepa incapaz de desplazarse en el medio semisólido, identificada por ausencia de halos de color rojo y restringida al pozo.

Tabla VII

Movilidad de las cepas de *C. jejuni* y de *C. coli*

<i>C. jejuni</i>		HALO DE MOVILIDAD ($\bar{x} \pm s$) ^a	<i>C. coli</i>		HALO DE MOVILIDAD ($\bar{x} \pm s$) ^a
De referencia	Cj 5653	3.07 \pm 0.01	Nativas	Cc 81	13.03 \pm 0.21
	Cj 180ip	0		Cc 60	12.67 \pm 0.01
	Cj 173ip	10.58 \pm 0.0		Cc 100	2.94 \pm 0.08
	Cj 57sp	0		Cc 1	7.45 \pm 0.3
	Cj 193ip	0		Cc 48	12.42 \pm 0.25
	Cj 238ip	5.64 \pm 0.48		Cc 90	4.11 \pm 0.07
	Cj 50sp	0		Cc BCO48h	13.69 \pm 0.01
Nativas	Cj 101	8.3 \pm 0.03		Cc 066F	0
	Cj 102	0		Cc 062F	0
	Cj 37	32.25 \pm 0.78		Cc 30PFB	0
	Cj 27PFF	12.82 \pm 0.17		Cc M424	0
	Cj 009B	0		Cc 054B	0
	Cj 060B	0		Cc 074F	0
	Cj 034B	3.7 \pm 0.37		Cc 61PVT	0
	Cj 35PVB	9.64 \pm 2.49		Cc 67PVB	1.99 \pm 0.58
	Cj 31PVB	2.22 \pm 0.2		Cc 68PVB	0

^a Valor promedio \pm desviación estándar en milímetros.



Gráfica 1. Movilidad de las cepas de *C. jejuni* (A) y de *C. coli* (B).

8.2.1 Prueba de Kruskal-Wallis para evaluar la Movilidad

Los resultados de las pruebas se muestran en la tabla VIII. Las diferencias del grado de movilidad entre las cepas de *C. jejuni* y de *C. coli* son estadísticamente significativas. Por tal motivo, se aplicó la prueba de Dunn con el fin de conocer cuáles cepas difieren entre sí. Los resultados de esta prueba se presentan en el Apéndice A2, donde se observó una diferencia entre las cepas móviles y las no móviles. Las diferencias más significativas entre las cepas se presentaron como se indica a continuación: a) En *C. jejuni*, Cj 37 fue diferente a Cj 009B, Cj 060B, Cj 102, Cj 180ip, Cj 193ip, Cj 50sp y Cj 57sp; b) En *C. coli*, Cc 81 y Cc BCO48h fueron diferentes a Cc 054B, Cc 062F, Cc 066F, Cc 074F, Cc 30PFB, Cc 61PVT, Cc 68PVB y Cc M424.

Tabla VIII

Prueba de Kruskal-Wallis (H) para la movilidad de *C. jejuni* y *C. coli*

	Método	gl	χ^2 (H)	Prob.	Decisión (0.05)
<i>C. jejuni</i>	No corregido para repeticiones	15	42.82653	0.000168	Rechazar H0
	Corregido para repeticiones	15	46.74384	0.000040	Rechazar H0
	No. de grupos de repeticiones	2			
	Factor de multiplicidad	9264			
<i>C. coli</i>	No corregido para repeticiones	15	41.05102	0.000314	Rechazar H0
	Corregido para repeticiones	15	46.90672	0.000038	Rechazar H0
	No. de grupos de repeticiones	1			
	Factor de multiplicidad	13800			

8.3 Quimiotaxis

La mayoría de los agentes quimiotácticos que se utilizaron como atrayentes no afectaron el comportamiento de las cepas, excepto el L-glutamato que tuvo un efecto atrayente para 12 cepas (Cj 50sp, Cj 238ip, Cj 35PVB, Cj 31PVB, Cc 1, Cc 48, Cc 60, Cc M424, Cc 074F, Cc BCO48h, Cc 61PVT y Cc 68PVB). Además, el L-ácido aspártico tuvo el mismo efecto para Cj 61PVB y Cj 68PVB, lo mismo que el citrato para Cc 61PVT. Sin embargo, el citrato, el L-glutamato y la L-cisteína (compuestos reportados previamente como atrayentes) actuaron como repelentes en Cj 37, Cc 90 y Cc 48, respectivamente (tablas IX y X). Todos los agentes quimiotácticos que se utilizaron como repelentes afectaron del modo esperado el comportamiento de la mayoría de las cepas. Solamente el ácido cólico no tuvo efecto sobre las cepas analizadas Cj 57sp, Cj 180ip, Cj 50sp, Cj 060B, Cj 034B, Cj 27PFF, Cc 100, Cc 066F, Cc 30PFB y Cc BCO48h.

Cuando se analizó el efecto de los agentes quimiotácticos en los ensayos en placa, no se encontró ningún efecto negativo sobre la viabilidad de las cepas analizadas. Los resultados del ensayo realizado en tubo no mostraron diferencias significativas entre las lecturas de Trans_{600} y UFCs, es decir, los AQ's no estimularon el crecimiento durante el periodo de incubación de 4h.

En las figuras 8 y 9 se muestra cómo se realizaron los ensayos y la interpretación de los mismos. Para esto se siguieron los criterios descritos por Hugdahl *et al.* (1988) y Hazeleger *et al.* (1998). Después de la incubación, alrededor de cada HAP se observó un halo claro u opaco. Los halos claros representan halos de repulsión, por migración de las bacterias alejándose del compuesto. Los halos opacos representan halos de atracción, por migración de las bacterias acercándose al compuesto.

Tabla IX
Quimiotaxis de las cepas de *Campylobacter jejuni*

Agentes Quimiotácticos [0.1M], pH 7.0		CEPAS ^a															
		De referencia							Nativas								
		Cj 5653	Cj 57sp	Cj 193ip	Cj 180ip	Cj 50sp	Cj 173ip	Cj 238ip	Cj 102	Cj 37	Cj 101	Cj 009B	Cj 060B	Cj 034B	Cj 27PFF	Cj 35PVB	Cj 31PVB
ATRAYENTES	L-glutamato (monosodio)	0	0	0	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	+	+
	L-serina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	L-ácido aspártico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Citrato (sodio)	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0
	L-cisteína hidroc্লorada	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
REPELENTES	Ácido taurocólico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ácido deoxicólico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ácido quenodeoxicólico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ácido cólico	-	0	-	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0	-	-

^a + quimiotaxis positiva (halo de atracción), - quimiotaxis negativa (halo de repulsión), 0 sin quimiotaxis.

Tabla X
Quimiotaxis de las cepas de *Campylobacter coli*

Agentes Quimiotácticos [0.1M], pH 7.0		CEPAS ^a															
		Nativas															
		Cc 90	Cc 81	Cc 1	Cc 48	Cc 100	Cc 60	Cc 054B	Cc 066F	Cc M424	Cc 062F	Cc 074F	Cc 30PFB	Cc BCO48h	Cc 61PVT	Cc 67PVB	Cc 68PVB
ATRAYENTES	L-glutamato (monosodio)	-	0	+	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	+
	L-serina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	L-ácido aspártico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	+
	Citrato (sodio)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0
	L-cisteína hidroc্লorada	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
REPELENTES	Ácido taurocólico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ácido deoxicólico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ácido quenodeoxicólico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ácido cólico	-	-	-	-	0	-	-	0	-	-	-	0	0	-	-	-

^a + quimiotaxis positiva (halo de atracción), - quimiotaxis negativa (halo de repulsión), 0 sin quimiotaxis.

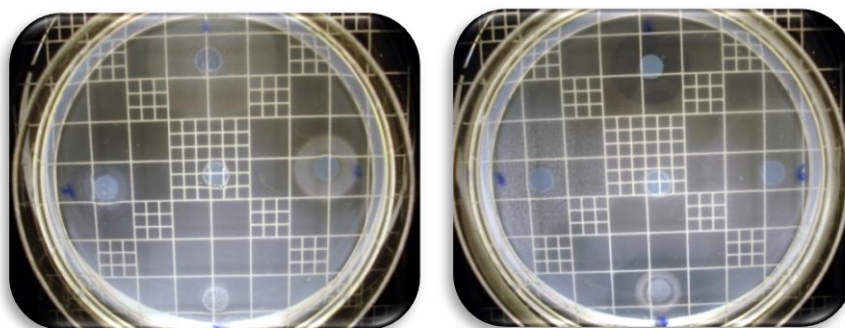


Figura 8. Ensayo de Quimiotaxis con *Campylobacter* sp. Método HAP (hard-agar plug) utilizado por Hugdahl *et al.* (1988) y Hazeleger *et al.* (1998). Agentes quimiotácticos: 0.1M, pH 7.0 en PBS. Incubación: 4h/42°C en microaerofilia. Formación de halos de atracción o de repulsión alrededor de los HAP's después de la incubación.

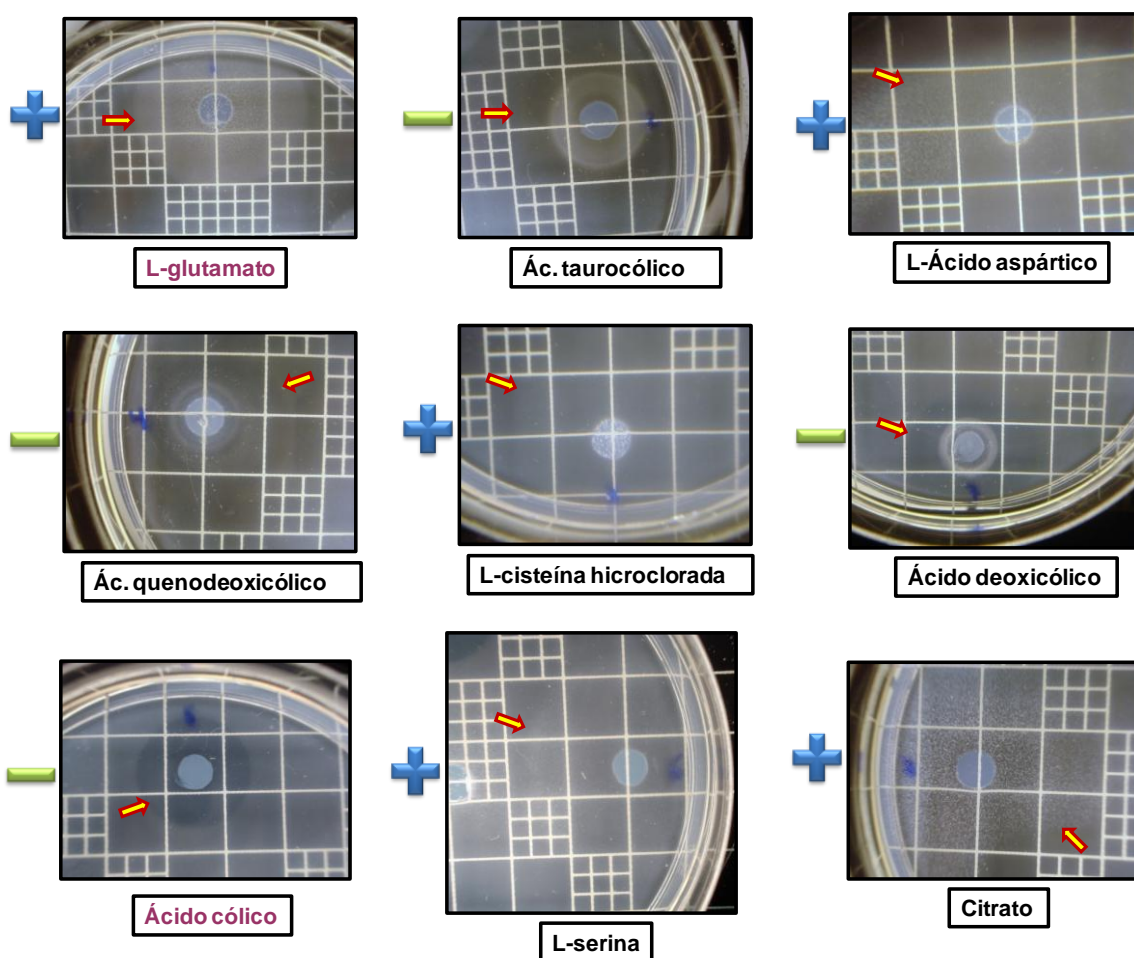


Figura 9. Halos de migración bacteriana por efecto de los Agentes Quimiotácticos. Los signos positivo y negativo al lado de cada imagen, indican que el compuesto actúo como atrayente (+) o repelente (-). La punta de las flechas indica el margen de los halos de atracción o de repulsión formados después de la incubación. Controles: L-glutamato (atrayente) y ácido cólico (repelente).

Actualmente se conocen varias proteínas PEB, que tienen una doble función al actuar como adhesinas y como transportadores de compuestos con gran afinidad por aminoácidos con carga negativa (aspartato y glutamato). Considerando esto, se evaluó el ácido aspártico y el L-glutamato a un pH menor a 7.0, usando la misma técnica de HAP. Los resultados se muestran en la tabla XI. Cuando estos dos compuestos se evaluaron a pH 7.0, la mayoría de las cepas no afectaron su comportamiento; pero a un pH menor, éstos sí actuaron como atrayentes en *C. coli* y en *C. jejuni*.

Tabla XI.

Quimiotaxis de las 32 cepas analizadas en contacto con aminoácidos a pH < 7.0^a

A) <i>Campylobacter jejuni</i>			B) <i>Campylobacter coli</i>				
	CEPAS	Ac. Aspártico (pH 2.88)	L-Glutamato (pH 6.77)		CEPAS	Ac. Aspártico (pH 2.88)	L-Glutamato (pH 6.77)
De referencia	Cj 5653	+	0	Nativas	Cc 81	+	0
	Cj 180ip	+	+		Cc 60	+	0
	Cj 173ip	+	0		Cc 100	+	0
	Cj 57sp	+	0		Cc 1	+	0
	Cj 193ip	+	+		Cc 48	+	+
	Cj 238ip	+	+		Cc 90	+	+
	Cj 50sp	+	0		Cc BCO48h	+	0
Nativas	Cj 101	+	0		Cc 066F	+	0
	Cj 102	0	+		Cc 062F	+	+
	Cj 37	+	+		Cc 30PFB	+	+
	Cj 27PFF	+	0		Cc M424	+	0
	Cj 009B	+	0		Cc 054B	0	0
	Cj 060B	+	+		Cc 074F	+	0
	Cj 034B	+	0		Cc 61PVT	-	+
	Cj 35PVB	+	+		Cc 67PVB	+	+
	Cj 31PVB	+	+		Cc 68PVB	+	+

^a Variable de respuesta: + quimiotaxis positiva (halo de atracción), - quimiotaxis negativa (halo de repulsión), 0 sin quimiotaxis.

8.3.1 Prueba de Friedman para evaluar la Quimiotaxis

Los resultados de esta prueba indicaron que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las cepas de *C. jejuni* y de *C. coli* (tabla XII), respecto al comportamiento quimiotáctico con los nueve AQ's evaluados a pH 7.0. Para más detalles del análisis estadístico, consultar el Apéndice A3.

Tabla XII

Prueba de Friedman para los ensayos de Quimiotaxis

	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>
N	9	9
$\chi^2_{r,0.05}$	15.488	17.075
gl	15	15
Sig.	0.417	0.314

8.4 Hemólisis

En las 32 cepas analizadas se detectó actividad hemolítica cuando se incubaron en una atmósfera con 33% de CO₂ a 35°C (tabla XIII). La actividad hemolítica tipo beta (β) se detectó como una zona clara en el medio, por debajo y en la periferia de la zona del crecimiento bacteriano (figura 10, *S. pyogenes* ATCC 19615 como control). La actividad hemolítica tipo alfa (α) se detectó como una zona roja-rosa en el medio de cultivo, por debajo del crecimiento bacteriano (figura 11, *S. sanguinis* ATCC 10556 como control). Se realizaron cortes finos de la zona debajo del crecimiento bacteriano y de la zona donde no se detectó hemólisis, se montaron en portaobjetos y se observaron en un microscopio óptico. En ambos tipos de hemólisis se observó un daño de la membrana de los eritrocitos presentes debajo de la zona del crecimiento bacteriano.

Hemólisis tipo β

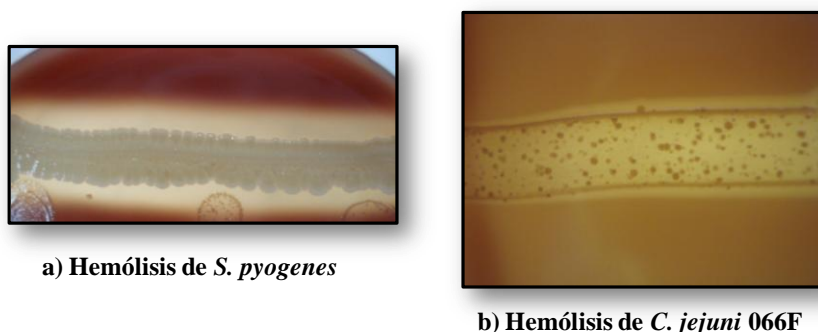


Figura 10. Hemólisis tipo Beta en las cepas de *C. jejuni* y de *C. coli*. a) Hemólisis beta típica de *S. pyogenes* ATCC 19615 (control). b) Hemólisis producida por una cepa de *C. jejuni*, identificada por una zona clara por debajo y alrededor del crecimiento bacteriano. Todas las cepas de *C. jejuni* y de *C. coli* analizadas mostraron la misma actividad hemolítica después de ser incubadas en una atmósfera de 33% CO₂ a 35°C y pH 7.5 durante 7 días en AMH con sangre.

Hemólisis tipo α

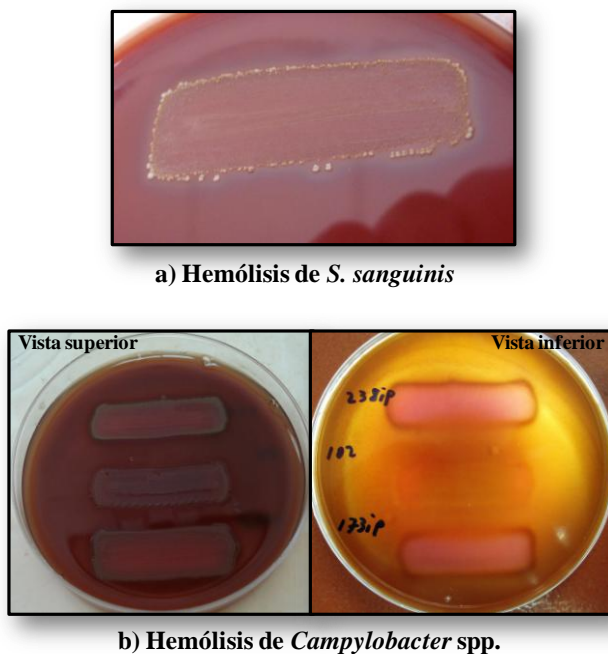


Figura 11. Hemólisis tipo Alfa de las cepas de *C. jejuni* y de *C. coli*. a) Hemólisis alfa típica de *S. sanguinis* ATCC 10556 (control). b) Hemólisis producida por tres cepas de *C. jejuni*, identificada por una zona rojo-rosa por debajo del crecimiento bacteriano (vista superior e inferior de la placa). Todas las cepas de *C. jejuni* y de *C. coli* analizadas mostraron la misma actividad hemolítica después de ser incubadas en una atmósfera de 33% de CO₂ a 35°C y pH 6.5 durante 2 días en AMH con sangre.

Tabla XIII
Actividad hemolítica de *C. jejuni* y *C. coli* ^a

		CEPAS															
		De referencia								Nativas							
		Cj 5653	Cj 57sp	Cj 193ip	Cj 180ip	Cj 50sp	Cj 173ip	Cj 238ip	Cj 102	Cj 37	Cj 101	Cj 009B	Cj 060B	Cj 034B	Cj 27PFF	Cj 35PVB	Cj 31PVB
<i>C. jejuni</i>	α -HLA ^b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	β -HLA ^c	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		Nativas															
<i>C. coli</i>	α -HLA ^b	Cc 90	Cc 81	Cc 1	Cc 48	Cc 100	Cc 60	Cc 054B	Cc 066F	Cc M424	Cc 062F	Cc 074F	Cc 30PFB	Cc BCO48h	Cc 61PVT	Cc 67PVB	Cc 68PVB
	β -HLA ^c	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

^a Cepa: hemolítica (+), no hemolítica (-); ^b α -HLA = hemólisis tipo alfa; ^c β -HLA = hemólisis tipo beta.

8.4.1 Prueba de Friedman para evaluar la Hemólisis

Todas las cepas presentaron actividad hemolítica, por tanto no hay variación en la expresión de este factor de virulencia y debido a eso no fue necesario analizar la variación entre las cepas. Sin embargo, los datos codificados se utilizaron para realizar los análisis multivariantes: 0 = sin actividad hemolítica, 1 = con actividad hemolítica.

8.5 Ensayos de Adhesión, Invasión y Citotoxicidad

a) Viabilidad de la línea celular Vero

Previo a realizar los ensayos de adhesión e invasión celular y de citotoxicidad, la viabilidad de la línea celular Vero se determinó entre el 90% y el 95%. Esto se determinó cuantificando el número de células vivas y muertas por cada 100 células observadas en diferentes campos visuales de un microscopio óptico y con el uso de una cámara de Neubauer, después de agregarles MTT, en cada subcultivo de la línea celular. Previo a la tripsinización, las células Vero se observaban formando una monocapa confluyente con células típicas de esta línea celular (figura 12A); después de la tripsinización las células se redondearon, quedando suspendidas en el medio de cultivo

Guadalupe Ismael Malagón Santiago

(figura 12B). Después de realizar el subcultivo, se tomaron alícuotas del inóculo restante y se agregó MTT. Este compuesto fue reducido a formazan por acción de la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial de las células vivas. Las células teñidas de color violeta (formazan) eran viables, las células sin teñir estaban muertas. La tinción de las células con MTT es directamente proporcional a la viabilidad de las mismas.

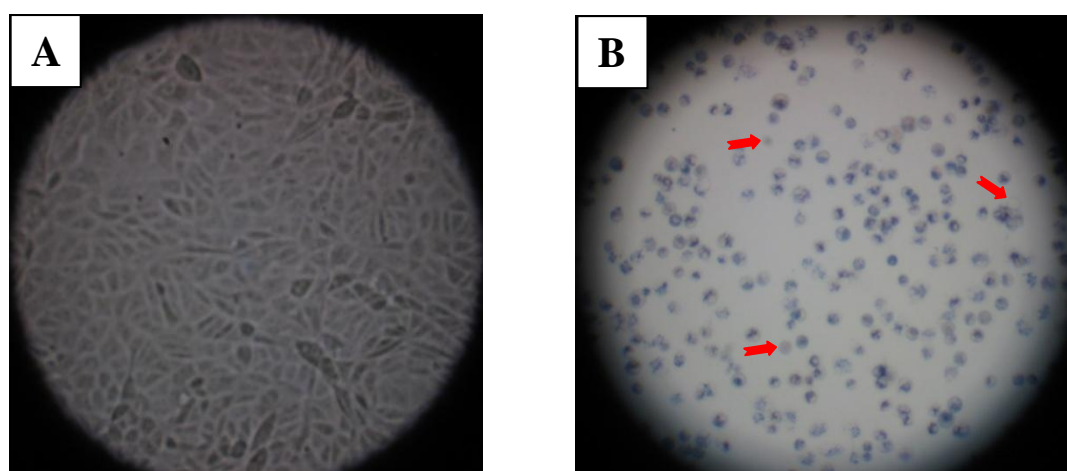


Figura 12. Línea Celular Vero. A) Monocapa confluyente de células Vero en cultivo con DMEM. B) Células Vero teñidas con MTT después de ser tripsinizadas durante el subcultivo de la línea celular. Las flechas rojas señalan células no teñidas (células muertas).

b) Adhesión e Invasión Celular

En todas las cepas de *C. coli* y de *C. jejuni* analizadas se detectó adherencia e invasión sobre la línea celular Vero. El inóculo bacteriano inicial fue de 1×10^6 UFC. En *C. jejuni* se cuantificó $1.7 \times 10^4 \pm 3.7 \times 10^3$ UFC adherentes y $6.4 \times 10^1 \pm 2.8 \times 10^1$ UFC invasivas. En *C. coli* se cuantificó $8.3 \times 10^3 \pm 2.9 \times 10^3$ UFC adherentes y $9.8 \times 10^1 \pm 2.0 \times 10^1$ UFC invasivas. Los resultados indicaron que *C. jejuni* tiene un mayor grado de adhesión celular (1.69%) y una menor invasión (0.006%) comparadas con la adhesión celular (0.836%) y la invasión celular (0.0098%) de *C. coli* (tabla XIV). En general, las células bacterianas adheridas representaron menos del 5% y las invasivas (bacterias que atravesaron la membrana de las células Vero) representaron menos del 1% del inóculo inicial. Sin embargo, existe una gran variación en las UFCs recuperadas de ambos factores de virulencia. Las cepas con mayor adherencia fueron: Cj 102, Cj 5653, Cj 37, Cj 50sp, Cj 173ip, Cj 31PVB, Cc 1, Cc 60, Cc 054B, Cc M424 y Cc61PVT. Y las cepas más invasivas fueron: Cj 193ip, Cj 173ip, Cj 238ip, Cj 27PFF, Cc 100, Cc 60, Cc M424, Cc 062F y Cc BCO48h.

Las bacterias que se adhirieron e internalizaron en las células Vero se observaron aplicando la técnica de AO-CV, utilizando un Microscopio de Epifluorescencia. Después de fijar células Vero en cubreobjetos e incubándose con las cepas de *Campylobacter*, las bacterias teñidas de color verde (bacterias viables) se observaron agregadas en la membrana de las células Vero. Debido a que el naranja de acridina tiñe ADN, el núcleo de las células Vero también se observó de color verde. Esto no interfirió con la visualización de las bacterias. En los ensayos no se observaron bacterias muertas (bacterias teñidas de color naranja) (figura 13).

Tabla XIV
Adhesión e Invasión de *C. jejuni* y *C. coli* sobre Vero

Cepas ^a		Adheridas ^b (UFC)	Invasivas ^b (UFC)	Adheridas (%)	Invasivas (%)
<i>C. jejuni</i>	De referencia				
	Cj 57sp	4.3x10 ³ ± 2.2x10 ²	4.2x10 ¹ ± 3x10 ¹	0.43	0.0042
	Cj 5653	3.5x10 ⁴ ± 1.2x10 ⁴	8x10 ¹ ± 2.6x10 ¹	3.5	0.008
	Cj 193ip	3.5x10 ³ ± 2.2x10 ²	1.7x10 ² ± 9.8x10 ¹	0.35	0.017
	Cj 180ip	3.3x10 ³ ± 2.9x10 ²	1.8x10 ¹ ± 1x10 ¹	0.33	0.0018
	Cj 50sp	6.3x10 ⁴ ± 12.2x10 ⁴	7x10 ⁰ ± 5x10 ⁰	6.3	0.0007
	Cj 173ip	1.9x10 ⁴ ± 1.2x10 ³	1.4x10 ² ± 2.1x10 ¹	1.9	0.014
	Cj 238ip	2.1x10 ³ ± 2.1x10 ²	1.4x10 ² ± 1.4x10 ¹	0.21	0.014
	Nativas				
	Cj 101	1.2x10 ³ ± 2.8x10 ²	3x10 ⁰ ± 1x10 ⁰	0.12	0.0003
	Cj 102	2.3x10 ⁴ ± 7.7x10 ²	5.5x10 ¹ ± 3.5x10 ¹	2.3	0.0055
	Cj 37	4x10 ⁴ ± 1.2x10 ⁴	1x10 ¹ ± 1x10 ⁰	4	0.001
	Cj 009B	1.2x10 ³ ± 8.4x10 ¹	3x10 ¹ ± 3x10 ⁰	0.12	0.003
	Cj 060B	7.9x10 ³ ± 5x10 ²	2x10 ⁰ ± 1x10 ⁰	0.79	0.0002
	Cj 034B	2.9x10 ³ ± 2x10 ²	5x10 ¹ ± 2.3x10 ¹	0.29	0.005
	Cj 27PFF	3.3x10 ³ ± 1.2x10 ³	2.6x10 ² ± 1.8x10 ²	0.33	0.026
	Cj 35PVB	6.6x10 ³ ± 4.9x10 ³	7x10 ⁰ ± 4x10 ⁰	0.66	0.0007
	Cj 31PVB	5.4x10 ⁴ ± 1.3x10 ⁴	1.2x10 ¹ ± 2x10 ⁰	5.4	0.0012
	Promedio	1.7x10⁴ ± 3.7x10³	6.4x10¹ ± 2.8x10¹	1.69	0.006
<i>C. coli</i>	Nativas				
	Cc 90	2.2x10 ³ ± 2.5x10 ²	6.2x10 ¹ ± 7x10 ⁰	0.22	0.0062
	Cc 81	1.9x10 ³ ± 9.6x10 ²	1.4x10 ¹ ± 1.2x10 ¹	0.19	0.0014
	Cc 1	1.2x10 ⁴ ± 2.1x10 ³	7x10 ⁰ ± 5x10 ⁰	1.2	0.0007
	Cc 48	4.1x10 ³ ± 9.9x10 ²	1.3x10 ¹ ± 1x10 ¹	0.41	0.0013
	Cc 100	5x10 ³ ± 2.5x10 ³	1.7x10 ² ± 5x10 ¹	0.5	0.017
	Cc 60	1x10 ⁴ ± 1x10 ³	1.6x10 ² ± 2.1x10 ¹	1	0.016
	Cc 054B	3.8x10 ⁴ ± 1.3x10 ⁴	3x10 ⁰ ± 1x10 ⁰	3.8	0.0003
	Cc 066F	3.9x10 ³ ± 3.6x10 ³	1x10 ¹ ± 1x10 ⁰	0.39	0.001
	Cc M424	1.8x10 ⁴ ± 1.2x10 ⁴	5.7x10 ² ± 7x10 ¹	1.8	0.057
	Cc 062F	5.8x10 ³ ± 2x10 ²	2.8x10 ² ± 8.4x10 ¹	0.58	0.028
	Cc 074F	5.4x10 ³ ± 1.9x10 ³	2.7x10 ¹ ± 1.8x10 ¹	0.54	0.0027
	Cc 30PFB	3.3x10 ³ ± 1.3x10 ³	2x10 ⁰ ± 1x10 ⁰	0.33	0.0002
	Cc BCO48h	4.4x10 ³ ± 1.2x10 ³	2.3x10 ² ± 2.3x10 ¹	0.44	0.023
	Cc 61PVT	1x10 ⁴ ± 1.8x10 ³	1.2x10 ¹ ± 1.1x10 ¹	1	0.0012
	Cc 67PVB	3.6x10 ³ ± 1.3x10 ³	2x10 ⁰ ± 1x10 ⁰	0.36	0.0002
	Cc 68PVB	4.5x10 ³ ± 2.3x10 ³	5x10 ¹ ± 5x10 ⁰	0.45	0.0005
	Promedio	8.3x10³ ± 2.9x10³	9.8x10¹ ± 2x10¹	0.836	0.0098

^a Inóculo inicial: 1x10⁶ UFC = 100%; ^b Valor promedio ± desviación estándar de UFC.

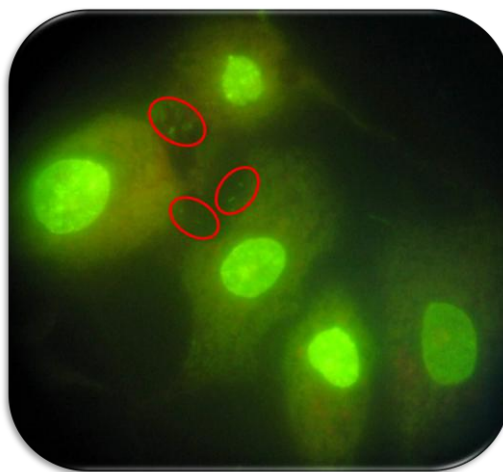


Figura 13. Visualización de las células de *C. jejuni* 5653 en las células Vero con microscopio de epifluorescencia, utilizando la técnica de tinción AO-CV. Las células bacterianas están teñidas de color verde (señaladas con las elipses de color rojo), al igual que el núcleo de las células Vero.

c) Prueba de ANOVA para evaluar la Adhesión e Invasión Celular

De acuerdo a los resultados de las pruebas, el análisis estadístico mostró que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las cepas de *C. jejuni*; lo mismo ocurrió con las cepas de *C. coli*, respecto a la adhesión e invasión celular (tabla XV). Sin embargo, la diferencia entre el grado de adhesión celular comparado con el grado de invasión celular (bloques), es estadísticamente significativa. Es decir, no hubo una gran diferencia entre el número de bacterias adherentes o invasivas en las células Vero, sin embargo, se observó que el número de bacterias adherentes es mayor que las invasivas.

Tabla XV

ANOVA para la Adhesión e Invasión de *C. jejuni* y *C. coli*

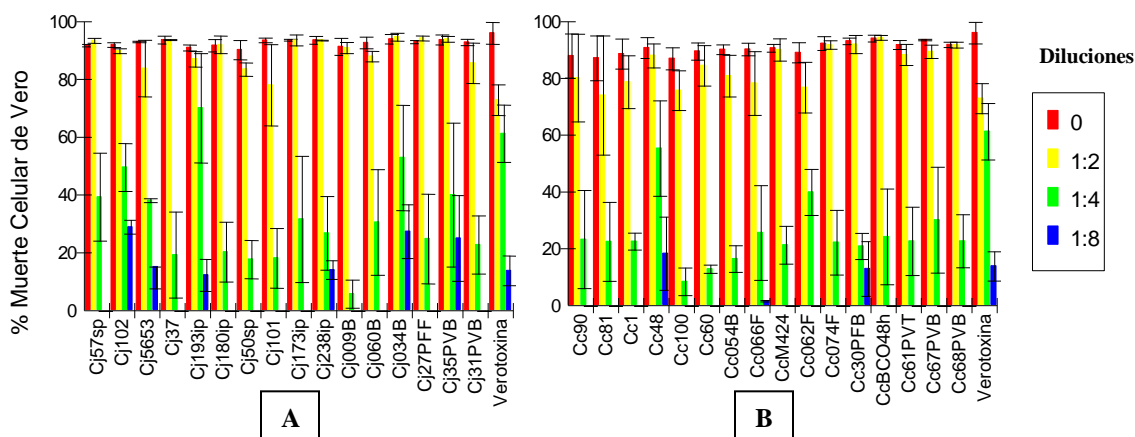
Variable Dependiente: Logaritmo					
	Suma de Cuadrados ^a		Cuadrados Medios	F	Sig.
Fuente	Tipo III	gl			
Modelo	280.182 ^b	17	16.481	38.168	.000
Cepa	4.895	15	.326	.756	.703
<i>C. jejuni</i> Bloque	47.483	1	47.483	109.963	.000
Error	6.477	15	.432		
Total	286.659	32			
Modelo	264.133 ^c	17	15.537	42.812	.000
Cepa	6.103	15	.407	1.121	.414
<i>C. coli</i> Bloque	45.387	1	45.387	125.061	.000
Error	5.444	15	.363		
Total	269.577	32			

^a Alfa = 0.05; ^b $R^2 = 0.977$ (R^2 ajustado = 0.952); ^c $R^2 = 0.980$ (R^2 ajustado = 0.957)

d) Citotoxicidad

Para evaluar la producción de la CDT, se utilizaron dos técnicas. En la primera, los filtrados bacterianos del cultivo bifásico provocaron una distensión de las células Vero, además de un aumento en la proliferación de la línea celular. Este mismo efecto se observó con el ICC (control). En los ensayos se observó que al añadir el MTT e incubar por 3h, la producción de formazan era mayor en los pozos con los filtrados de las cepas y en el ICC comparados con el control negativo, con la Verotoxina y en los pozos con las diluciones más altas de la CDT (figura 14a). En la segunda técnica empleada, a partir de células bacterianas tratadas con polimixina B, se observaron células Vero dañadas y muertas cuando estuvieron en contacto con los filtrados bacterianos (sin diluir) de todas las cepas y con la Verotoxina (figura 14b). Al verlas en el microscopio, las células Vero se observaron redondeadas y desprendidas de la superficie del pozo (figura 15).

Suponemos que este efecto citotóxico en las células Vero fue ocasionado por efecto de la CDT que expresaron las cepas de *C. coli* y de *C. jejuni*. De acuerdo con Coote y Arain (1996), quienes trabajaron con la misma línea celular, la polimixina B promueve un aumento en la producción de la CDT y la enterotoxina; y solo la CDT causa muerte celular (Wassenaar, 1997; Whitehouse et al., 1998; Pickett y Lee, 2005). Los filtrados bacterianos del cultivo bifásico promovieron la proliferación celular (entre un 20% y un 60%) en lugar de la muerte celular de las células Vero, posiblemente este efecto se debió a los nutrientes del ICC. Los datos que se presentan a continuación, corresponden a los efectos de los filtrados de la CDT producida y liberada con polimixina B. Los títulos de la CDT₅₀ se detectaron en la dilución 1:2 en la mayoría de las cepas. El efecto citotóxico de la CDT se detectó hasta la dilución 1:4 para la mayoría de las cepas, y hasta la dilución 1:8 para la Verotoxina y para las cepas Cj 102, Cj 5653, Cj 193ip, Cj 238ip, Cj 034B, Cj 35PVB, Cc 48, Cc 066F y Cc 30PFB. Estos resultados se reportaron como porcentaje de muerte celular de Vero (gráfica 2).



Gráfica 2. Muerte celular de Vero por efecto de la CDT de *Campylobacter*. A) Cepas de *C. jejuni*. B) Cepas de *C. coli*. CDT producida con polimixina B. La muerte celular de las células Vero se detectó en las 32 cepas de *Campylobacter*, al aplicar la CDT concentrada y diluida hasta 1:8.

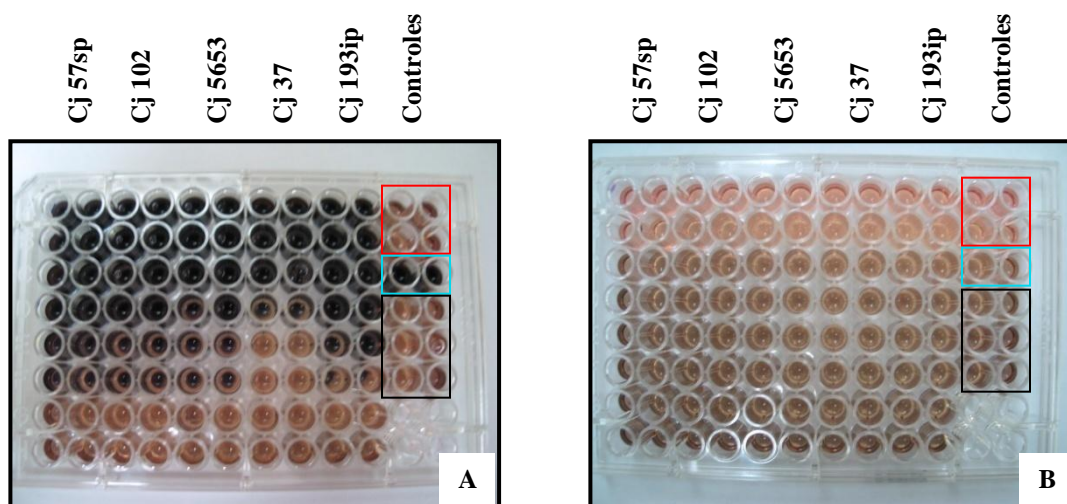


Figura 14. Ensayos de citotoxicidad. A) CDT producida en cultivo bifásico: en los pozos con CDT concentrada y con □ ICC hubo gran producción de formazan en 3h de incubación a diferencia de los pozos con □ Verotoxina (control +), □ sin CDT (control -) o con CDT muy diluida. B) CDT producida en DMEM+Polimixina B: en los pozos con CDT concentrada y con □ Verotoxina (control +) no hubo producción de formazan en 3h de incubación a diferencia de los pozos con □ Polimixina B, □ sin CDT (control -) o con CDT muy diluida.

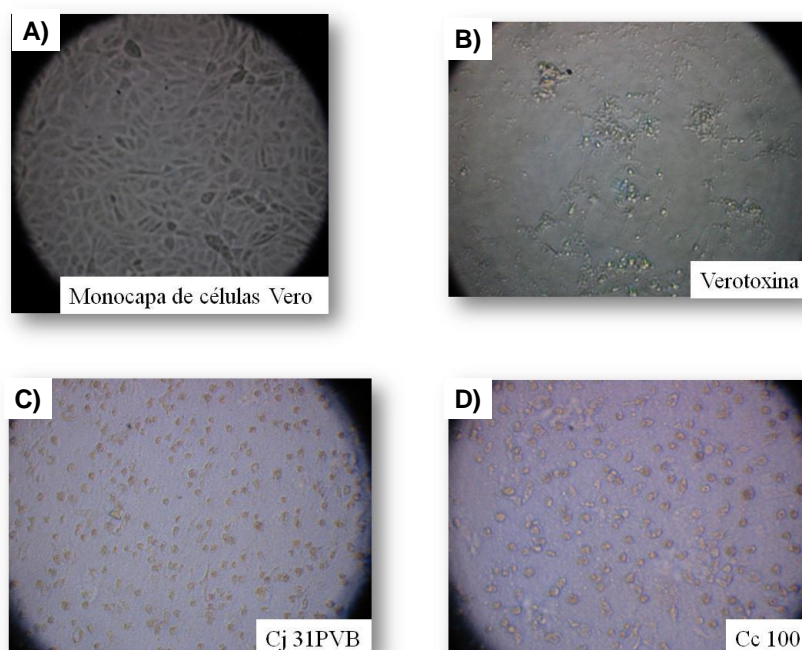


Figura 15. Citotoxicidad de la CDT en la línea celular Vero. Efecto citotóxico de la CDT producida por las cepas de *C. jejuni* y de *C. coli*, y liberada de las bacterias usando polimixina B. (A) Células Vero en monocapa confluyente, sin CDT; (B) Células Vero muertas por efecto de la Verotoxina (control); (C y D) Células Vero muertas por efecto de la CDT (sin diluir) producida por las cepas bacterianas Cj 31PVB y Cc 100, respectivamente.

d) Prueba de ANOVA para evaluar la Citotoxicidad

De acuerdo a los resultados, el análisis estadístico mostró que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las cepas de *C. jejuni*; lo mismo ocurrió con las cepas de *C. coli* (tabla XVI). Es decir, el efecto citotóxico de la CDT en las células Vero es el mismo entre las cepas de *C. jejuni* y de *C. coli*.

Tabla XVI

ANOVA para la Citotoxicidad de *C. jejuni* y *C. coli*

	Fuente	DF	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F	Prob	Potencia (Alfa=0.05)
<i>C. jejuni</i>	Cepas	16	1345.098	84.06863	0.06	1.000000	0.066800
	Error	41	58448.65	1425.577			
	Total (Ajustado)	57	59793.75				
	Total	58					
<i>C. coli</i>	Cepas	16	1994.41	124.6506	0.08	0.999998	0.074494
	Error	38	55769.99	1467.631			
	Total (Ajustado)	54	57764.4				
	Total	55					

8.6 Análisis estadísticos adicionales

8.6.1 Modelación matemática de *Campylobacter* sp.

A partir del modelo Linear se construyó el modelo Inverso, el cual se utilizó para ajustar los inóculos de las cepas en todos los ensayos (tabla XVII). También ayudó a estimar el error para cualquier otro valor deseado dentro del intervalo de 0 a 12×10^8 UFC/ml. El modelo inverso tiene un $R^2 = 0.999$, lo cual significa que es excelente para modelar y estimar cualquier valor, de forma directa o inversa, el inóculo de las bacterias; esto se logró tomando como base la escala de McFarland y sus respectivos valores en transmitancia. En el Apéndice A1 se muestran los detalles de los modelos.

Tabla XVII

Modelos matemáticos de las curvas de calibración de *Campylobacter* sp.^a

UFC/ml (x10 ⁸)	McFarland	TRANSMITANCIA ₆₀₀ (%)	Modelos Matemáticos	
Y	X	X	<i>LINEAR</i> ^b $\hat{Y} = B_1 X$	<i>INVERSO</i> ^c $\hat{Y} = B_0 + B_1/X$
0	0	100	0	0.2
1.5	0.5	74.3	1.5	1.4
3	1	55.6	3	2.8
6	2	35.6	6	6
9	3	26.4	9	9.2
12	4	21.5	12	11.9

^aX = var. independiente; Y = var. dependiente; \hat{Y} = valor estimado de la var. dependiente; B₀ y B₁ = constantes de las fórmulas.
^bModelo Linear: B₁ = 3; X = valor de escala McFarland. R² = 1
^cModelo Inverso: B₀ = -2.956; B₁ = 319.876; X = valor de transmitancia (%). R² = 0.999

8.6.2 Análisis Multivariantes

El análisis de componentes principales (ACP) extrajo dos componentes de los 7 factores analizados (ver gráfica 3 y tabla XVIII), en los que se acumuló más del 70% de la información. El primer componente agrupó a la quimiotaxis, a la actividad hemolítica, a la adhesión celular y a la CDT; estos factores están relacionados con componentes de la pared celular bacteriana, específicamente con proteínas presentes en esta parte de la célula. El segundo componente agrupó a la movilidad celular, que puede deberse principalmente a los flagelos bacterianos. En términos biológicos, este análisis permitió explicar la virulencia de *C. jejuni* y de *C. coli*, la cual se debe principalmente a dos factores (tabla XIX): 1) los componentes de la pared celular y 2) la movilidad celular. La invasión celular es el único factor de virulencia que influyó de manera casi equitativa entre los dos componentes.

Tabla XVIII

Varianza Total Explicada del ACP

Componente	Autovalores Iniciales			Extracción de Suma de Cuadrados			Rotación de Suma de Cuadrados		
	Total	% de la Varianza	% Acumulativo	Total	% de la Varianza	% Acumulativo	Total	% de la Varianza	% Acumulativo
1	4.274	61.052	61.052	4.274	61.052	61.052	4.100	58.569	58.569
2	1.079	15.420	76.472	1.079	15.420	76.472	1.253	17.903	76.472
3	.857	12.237	88.709						
4	.462	6.605	95.313						
5	.224	3.198	98.512						
6	.104	1.488	100.000						
7	1.53E-016	2.18E-015	100.000						

Método de Extracción: Análisis de Componentes Principales.

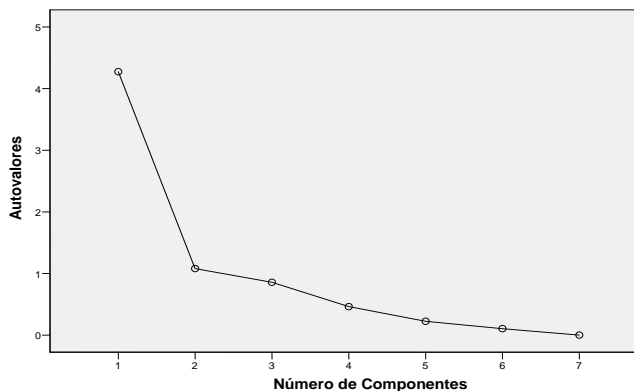
Guadalupe Ismael Malagón Santiago

Tabla XIX

Matriz de Componentes

Factores de Virulencia	Componente	
	1 Componentes de la Pared Celular	2 Movilidad Celular
Movilidad	.185	.935
Quimiotaxis	.924	-.238
Hemólisis tipo Alfa	.971	-.094
Hemólisis tipo Beta	.971	-.094
Adhesión Celular	.863	-.071
Invasión Celular	.406	.260
CDT	.769	.240

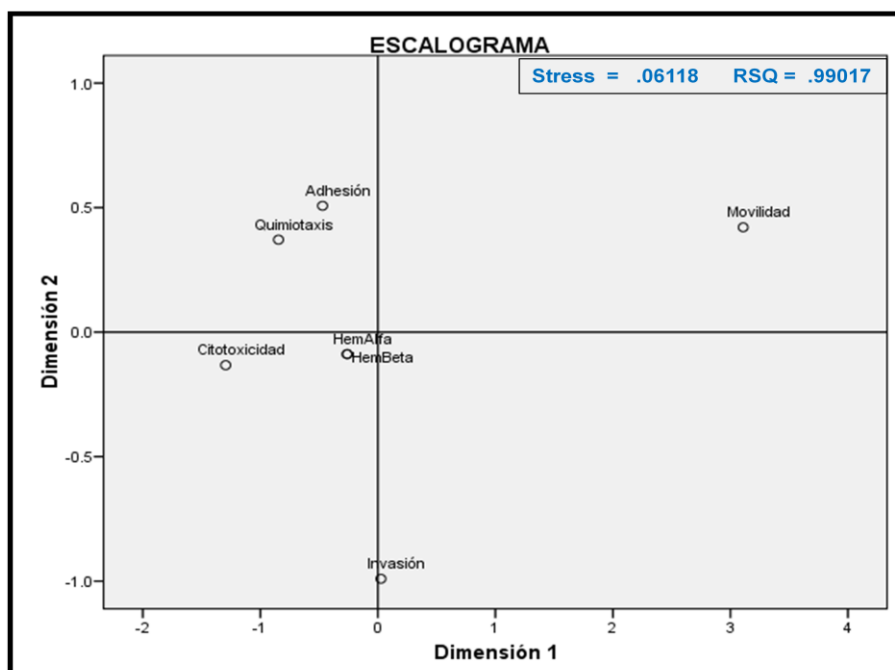
Método de Extracción: Análisis de Componentes Principales.



Gráfica 3. Gráfico de Sedimentación

El escalamiento multidimensional métrico (ALSCAL) permitió evaluar las relaciones o independencia entre los factores de virulencia analizados para las 32 cepas de *Campylobacter*, además de confirmar gráficamente los resultados obtenidos en el ACP respecto a los factores de virulencia agrupados para los componentes nombrados “Componentes de la Pared Celular” y “Movilidad Celular”. Estos resultados se observan en el escalograma de la gráfica 4. El error y el ajuste para este modelo multidimensional (coeficiente de determinación) son: Stress = 0.06118, RSQ = 0.99017. El gráfico de ajuste lineal para el modelo de distancia euclidiana, muestra que entre las distancias y las disparidades, el modelo se ajusta correctamente de manera lineal (ver apéndice 7). Todos estos resultados indican que el modelo dimensional es correcto y confiable para evaluar la relación entre los factores de virulencia analizados.

En el mapa dimensional (escalograma), la movilidad y la invasión son los factores de virulencia más distantes de los demás. La adhesión y la quimiotaxis forman un grupo, al igual que la hemólisis tipo alfa y tipo beta. La citotoxicidad está próxima a la adhesión, a la quimiotaxis y la actividad hemolítica. En la dimensión 1, la citotoxicidad y la movilidad son los factores de virulencia que determinan el eje vertical. En la dimensión 2, la adhesión y la invasión son los factores de virulencia que determinan el eje horizontal.



Gráfica 4. Escalamiento Multidimensional métrico (ALSCAL). La movilidad y la invasión de *Campylobacter* son los más distantes del resto de los factores de virulencia. La actividad hemolítica es la variable de menor peso en ambas dimensiones.

Respecto al Análisis de Correlación Múltiple de los Factores de Virulencia, los resultados de la prueba mostraron una correlación menor al 35% en la mayoría de los casos. Es decir, cada uno de ellos es independiente y poco influenciado por los demás factores. En las matrices de proximidad resaltaron tres aspectos importantes: 1) la actividad hemolítica carece de una correlación lineal con los demás factores de virulencia, 2) en *C. jejuni*, las correlaciones más importantes se dieron entre la movilidad con la CDT ($\rho = 0.598$) y con la quimiotaxis ($\rho = -0.524$), y 3) en *C. coli*, la correlación más importante se dió entre la invasión celular y la fuente de aislamiento ($\rho = 0.539$), y 3). Para mayores detalles, consultar el Apéndice A7.

9. DISCUSIÓN

De los diferentes factores de virulencia analizados, los más constantes entre las cepas fueron la actividad hemolítica y la citotoxicidad. La movilidad es el único de estos factores que parece no estar presente en algunas de las cepas analizadas. No se está afirmando que dichas cepas sean inmóviles o que carezcan de flagelos, simplemente no mostraron movilidad en las condiciones en las que se realizaron los ensayos. Sin embargo, hay que considerar que esta característica puede ser influenciada por las condiciones del medio ambiente. Algunas condiciones que se han reportado afectan la movilidad en las bacterias incluyen la viscosidad, el pH y el diseño estructural del flagelo (Schneider y Doetsch, 1974; Greenberg y Canale, 1977; Ferrero y Lee, 1988; Szymanski *et al.*, 2005; Goon *et al.*, 2006). Nuijten *et al.*, (1989) y Guerry *et al.* (2006) han mencionado al respecto que la expresión de las flagelinas es regulada a nivel transcripcional, y además observaron que esta actividad es reversible.

Se ha establecido que en ambientes viscosos, las bacterias en forma de bacilo y con flagelos peritricos o polares (como *Campylobacter*) presentan una mayor movilidad que en medios o ambientes no viscosos. También la conformación de la hélice flagelar afecta la eficiencia de la propulsión (Schneider y Doetsch, 1974). La alta movilidad que poseen determinadas bacterias flageladas como *Pseudomonas* en ambientes viscosos, se debe a que poseen un aparato flagelar especializado que les confiere una mejor adaptación en tales ambientes (Greenberg y Canale-Parola, 1977; Ferrero y Lee, 1988). Estas mismas cualidades flagelares y ventajas ecológicas se observan en las cepas flageladas de *C. jejuni* (Ferrero y Lee, 1988, Szymanski *et al.*, 1995).

Debido a todos estos factores, se pueden detectar cepas flageladas móviles o no móviles, y cepas sin flagelo que se confundirían con las flageladas no móviles. En tales casos se requiere un análisis más detallado de la estructura de los flagelos, así como de sus genes *fla*. La importancia de los flagelos no sólo radica en la locomoción celular, ya que estas estructuras también están implicadas con otras actividades y factores de virulencia como en la adhesión e invasión celular (Grant *et al.*, 1993), en el transporte de proteínas con diferentes actividades biológicas (Konkel *et al.*, 2004; Poly *et al.*, 2007) así como en la respuesta inmune del hospedero (Hickey *et al.*, 1999; Zilbauer *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006; Johanesen y Dwinell, 2006). Se ha establecido que durante el proceso de infección, los flagelos son de los primeros factores implicados en el contacto celular e inicio de la infección. Todas estas características le confieren la cualidad de ser un factor de virulencia muy importante.

Se conoce que el éxito o fracaso de la infección también está determinada por las propiedades de las células susceptibles, por las sustancias del medio que pueden actuar como agentes quimiotácticos (Hugdahl *et al.*, 1988), como inhibidores o potenciadores del proceso infeccioso (Russell y Blake, 1994; Ruiz-Palacios, 2003; Malik-Kale *et al.*, 2008), por determinados genes de virulencia bacterianos tales como *che*, *peb*, *jlp*, *fla*, *maf* y *cia* (Yao *et al.*, 1997; Karlyshev *et al.*, 2002; van Alphen *et al.*, 2008) y por la respuesta del sistema inmune con la producción de interleucinas y defensinas del hospedero en contra de estos patógenos (Zilbauer *et al.*, 2005; van Alphen *et al.*, 2008).

La adhesión de bacterias en las células Vero resultó ser muy variable en las cepas analizadas en este trabajo. Esto también lo han reportado varios investigadores para ésta y para otras líneas celulares eucariotas (Konkel y Joens, 1989; Johanesen y Dwinell, 2006). Considerando que el número de bacterias y el tiempo de contacto influyen, no todas las cepas de *Campylobacter* spp. son adherentes o invasivas a las mismas líneas celulares (Friis *et al.*, 2005; van Alphen *et al.*, 2008) debido a que cada una expresa fenotipos epiteliales particulares.

La adherencia e invasión son dependientes de factores intrínsecos y extrínsecos a *Campylobacter* sp. Entre los factores dependientes están el tipo celular susceptible de infección (Konkel y Joens, 1989; Grant *et al.*, 1993), el sistema de microfilamentos y microtúbulos de la célula eucariota (Oelschlaeger *et al.*, 1993; Russell y Blake, 1994; Kopeko *et al.*, 2001; Biswas y Sasakawa, 2003; Monteville *et al.*, 2003), las proteínas de membrana o proteínas secretadas por *Campylobacter* como Maf, Fla, Cia, Ceu, CapA y PEB1 (de Melo y Pechère, 1990; Konkel *et al.*, 1999; Konkel *et al.*, 2004; León-Kempis *et al.*, 2006; Ashgar *et al.*, 2007), la alteración del potencial de membrana de la célula infectada (Russell y Blake, 1994; Dé *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2006), la secreción de sustancias en el líquido intersticial o en el tracto gastrointestinal del hospedero que alteran el comportamiento bacteriano (Hugdahl *et al.*, 1988; Malik-Kale *et al.*, 2008), incluso la presencia de enterovirus en las células eucariotas (Konkel y Joens, 1990). Todos estos factores determinan en parte el número de bacterias que logran atravesar e internalizarse en las células del huésped (Konkel y Joens, 1989; van Alphen *et al.*, 2008). También se ha demostrado en *C. jejuni* que el grado de invasión celular es dependiente del tiempo y del número de células bacterianas que están en contacto con el huésped (Russell y Blake, 1994), así como de la temperatura ya que este factor físico tiene influencia incluso a nivel genético alterando las rutas de señalización dependientes de temperatura como el sistema dual RacR-RacS (Rac - habilidad reducida de colonización) (Brás *et al.*, 1999). Se reconoce que la adherencia de *Campylobacter* spp. a determinadas líneas celulares es necesaria para la invasión, pero no se correlacionan el número de bacterias adheridas con el número de bacterias invasivas (intracelulares), ya que en estos dos procesos intervienen antígenos diferentes (Konkel y Joens, 1989).

En este estudio se evaluó el comportamiento de 32 cepas de *Campylobacter*, poniendo en contacto a las bacterias con diferentes sustancias previamente reportadas como atrayentes o repelentes. Los parámetros controlados fueron la temperatura (42°C), la atmósfera (microaerofilia: 10% CO₂, 5% O₂ y 85% N₂), el tiempo de contacto (4h), la cantidad de inóculo (4.5x10⁸ UFC/ml), el pH (pH 7.0 y pH < 7.0), el efecto de otro compuesto durante el ensayo en PBS (carencia de nutrientes) y los agentes quimiotácticos (atrayentes y repelentes a [0.1M]). Los repelentes utilizados fueron seleccionados por ser parte de los ácidos biliares del cuerpo humano; estos ocasionaron que las bacterias migraran en contra del gradiente, pero los atrayentes (ácido aspártico y L-glutamato) solo tuvieron un efecto de migración a favor del gradiente a un pH < 7.0 en la mayoría de las cepas. Nuestros resultados indicaron una respuesta diferencial frente a un determinado estímulo, debido tanto por las características propias de las cepas como por la intensidad o tipo de estímulo que afecta a las células bacterianas. Malik-Kale *et al.* (2008) demostraron que al cambiar las condiciones de cultivo, al poner en contacto a *C. jejuni* con deoxicolato de sodio, esta sustancia induce la expresión de genes de virulencia (*ciaB*, *cmeABC*, *dccR*, *tlyA*, etc.) y altera su comportamiento en la invasión celular, sin embargo no afecta a la motilidad ni la adherencia celular.

En nuestro estudio incluimos colatos y deoxicolatos (DOCs), los cuales son parte de los ácidos biliares. Se sabe que estas moléculas anfipáticas actúan como detergentes y tienen actividad antimicrobiana; su concentración promedio en el intestino humano varía de 0.2% a 2% (Malik-Kale *et al.*, 2008). Se ha demostrado que la bilis regula la expresión de genes de virulencia en varios patógenos gastrointestinales (Elliot, 1985; Osawa y Yamai, 1996; Gupta y Chowdhury, 1997; Pace *et al.*, 1997; Osawa *et al.*, 2002; Prouty *et al.*, 2004a,b; Begley *et al.*, 2005; Olive *et al.*, 2007). En el sistema gastrointestinal, considerando las condiciones dentro del huésped (por ejemplo, ácidos biliares y otros compuestos secretados, compuestos presentes en el bolo alimenticio y pH ácido), además de las características de las campilobacterias (por ejemplo, forma bacilar, orientación y desplazamiento flagelar, producción de toxinas y alta movilidad en medios viscosos), estas bacterias son estimuladas por todos los factores mencionados, ocasionando que atraviesen el mucus epitelial e infecten a los enterocitos. Iniciando de esta manera el proceso infeccioso o campilobacteriosis (Young *et al.*, 2007).

El 53% de las 32 cepas analizadas fueron móviles en las condiciones evaluadas. Entre la movilidad y la quimiotaxis se observó una correlación negativa del 52.4% en *C. jejuni* y del 13.3% en *C. coli*. La respuesta quimiotáctica de cada cepa dependió del agente quimiotáctico y del pH del medio. Aunque se reconoce que el desplazamiento de las bacterias flageladas está influenciado positivamente por la quimiotaxis, Takata *et al.* (1992) demostraron que cepas flageladas de *C. jejuni* “no quimiotácticas” son activamente móviles, y Malik-Kale *et al.* (2008) demostraron que la motilidad de *C. jejuni* no es afectada cuando está en contacto con deoxicolatos. La quimiotaxis como

factor de virulencia se ha estudiado principalmente en enterobacterias y otros patógenos de importancia para el hombre. Esto también ha sido estudiado en *Campylobacter* spp. por Paster y Gibbons (1986), por Hugdahl *et al.* (1988), Yao *et al.* (1997), Hazeleger *et al.* (1998) y por Ketley y Konkel (2005); quienes evaluaron el efecto de la temperatura y gradientes químicos de diversas sustancias en los procesos de movilidad, adhesión e invasión celular. Encontraron que el comportamiento quimiotáctico de *Campylobacter* spp. está influenciado por condiciones ambientales como la temperatura, la atmósfera y la concentración de determinados compuestos químicos en el ambiente. Por lo tanto, el desplazamiento bacteriano guiado por quimiotaxis, permite que las bacterias capaces de adaptarse mejor a sus hábitats naturales, migren de una condición de estrés a condiciones ambientales más favorables (Lux y Shi, 2004).

Los flagelos y la quimiotaxis determinan el movimiento bacteriano. Este fenómeno se lleva a cabo por señales químicas entre el ambiente y la célula bacteriana. Las rutas bacterianas de transducción de señales quimiotácticas están formadas por tres elementos básicos: 1) la recepción de la señal, detectada por quimiorreceptores localizados en la membrana, 2) la transducción de la señal, retransmitida de los receptores al motor flagelar (cuerpo basal), y 3) la adaptación de la señal, para responder a la señal inicial entrante (Lux y Shi, 2004).

Otros factores de virulencia de gran importancia son las toxinas. En esta investigación se determinó que las 32 cepas de *Campylobacter* nativas analizadas mostraron actividad hemolítica y un efecto citotóxico en la línea celular Vero. Suponemos que esta actividad hemolítica es por efecto de las proteínas tipo fosfolipasas presentes en la membrana de *C. jejuni* y *C. coli*. Dichas enzimas han sido detectadas y caracterizadas en *Campylobacter* spp. por Hossain *et al.* (1993), Richardson y Park (1995), Grant *et al.* (1997), Parkhill *et al.* (2000) e Istivan *et al.* (2004). La citotoxicidad de estas cepas en las células Vero es por efecto principal de la CDT y no por la acción de la enterotoxina (Coote y Arain, 1996). Los títulos de la CDT₅₀ se observaron en la dilución 1:2 en la mayoría de las cepas (gráficas 3 y 4), es decir, en ésta dilución se detectó >50% de muerte celular. A diferencia de la enterotoxina, la CDT causa la muerte celular al dañar el ADN de la célula eucariota (Whitehouse *et al.*, 1998, Pickett y Lee, 2005). Como respuesta al daño en el ADN, la CDT promueve mecanismos de reparación en el material genético del huésped (Hassane *et al.*, 2003), sin embargo, esto no es suficiente para que la célula hospedera se recupere. Es necesario un análisis más detallado del efecto de esta toxina, ya que no es la única reportada que causa daño celular. Recientemente se han identificado dos proteínas formadoras de poros en *C. jejuni*, la toxina RTX como factor tóxico activador de la CDT (Liu *et al.* (2007) y la proteína MOMP (Dé *et al.*, 2000). Aún no se conoce qué tanto contribuyen estas dos proteínas en la citotoxicidad producida por la CDT.

Se ha reportado que el hierro es un elemento importante para algunos patógenos como *Campylobacter*, debido a que afecta directamente a una gran cantidad de proteínas y genes, incluyendo los de virulencia (Park y Richardson, 1995; van Vliet *et al.*, 1998; Palyada *et al.*, 2004), dependiendo de la forma química y de qué tan disponible este en el medio (Pickett *et al.*, 1992). A excepción de la actividad hemolítica, todos los factores de virulencia de interés en este trabajo, se evaluaron en ausencia de hierro, lo que podría afectar los niveles de expresión de estos factores. Palyada *et al.* (2004) y Holmes *et al.* (2005) evaluaron el efecto del hierro como factor limitante en el medio, y determinaron algunos genes de virulencia que se sobreexpresaron (*sdh*, *nap*, *chu*, *ceu*, *cfr*, *kat*) o suprimieron (*nap*, *dsb*, *leu*, *chu*, *cfr*, *kat*) en *C. jejuni*. Estos investigadores observaron que cuando el hierro es un factor limitante, se reduce el nivel de glicosilación de las proteínas, se suprimen los genes para obtener hierro y para la defensa contra el estrés oxidativo, mientras que los genes del metabolismo energético son sobreexpresados.

El análisis estadístico de cada factor de virulencia mostró evidencia de diferencias significativas entre las cepas sólo para la movilidad. El ACP analizó de manera integral los factores de virulencia de las cepas nativas de *C. coli* y *C. jejuni*. Los resultados indicaron que la virulencia de estos patógenos pueden ser explicada por dos componentes principales, a partir de los factores de virulencia analizados: movilidad, quimiotaxis, hemólisis, adhesión e invasión celular y citotoxicidad. La matriz de componentes indicó la relación que guarda cada componente con los factores incluidos en el análisis. El primer componente relacionó cinco características, y debido a la naturaleza química y ubicación de las moléculas de dichos factores, a este primer componente se decidió nombrarlo “*Componentes de la Pared Celular*”; el segundo componente incluyó la movilidad, a éste se decidió nombrarlo “*Movilidad Celular*”. Los modelos generados con el ACP y el ALSCAL, pueden ser utilizados para generar un nuevo modelo biológico de la patogenicidad de *Campylobacter* o ayudar a mejorar los ya existentes; sin embargo, para desarrollar un modelo y un análisis completos de la patogenicidad de estas bacterias, es necesario estudiar los demás factores de virulencia que poseen, como los mecanismos de respuesta a estrés oxidativo y térmico, otros componentes de la pared celular (cápsula, LPS, LOS), sideróforos, plásmido *pVir* y otras toxinas. Una vez que se cuente con toda esta información, el ACP es una herramienta que puede ser utilizada para explicar la patogenicidad de las cepas con un número reducido de componentes, además de evaluar la importancia relativa de cada factor en el proceso infeccioso de la campilobacteriosis.

En este trabajo se analizaron algunos factores de virulencia de *Campylobacter* en cepas nativas mexicanas. Con esta información se pretende evidenciar su importancia en México, y proponemos como meta que las autoridades sanitarias del país consideren la inclusión de *Campylobacter* en los análisis microbiológicos de rutina: clínicos, ambientales y sanitarios.

10. CONCLUSIONES

1. En el 53% de las cepas de *C. coli* y de *C. jejuni* se detectó movilidad en las condiciones evaluadas. La cepa Cj 37 fue la que presentó el mayor grado de movilidad.
2. Los repelentes afectaron el comportamiento quimiotáctico de las cepas, sin embargo, los atrayentes no tuvieron efecto en la mayoría de las cepas, en las condiciones evaluadas a pH 7.
3. En las 32 cepas analizadas se detectó actividad hemolítica tipo alfa y tipo beta.
4. Las cepas de *C. jejuni* mostraron una mayor adhesión y una menor invasión celular, comparadas con las cepas de *C. coli*.
5. Las 32 cepas tuvieron un efecto citotóxico en la línea celular Vero.
6. La virulencia de estos patógenos puede ser explicada principalmente por los componentes de su pared celular y por su movilidad.

11. LITERATURA CITADA

- AbuOun M, Manning G, Cawthraw SA, Ridley A, Ahmed H, Wassenaar TM and Newell DG. 2005. Cytolethal Distending Toxin (CDT)-Negative *Campylobacter jejuni* strains and anti-CDT neutralizing antibodies are induced during human infection but not during colonization in chickens. *Infect. Immun.* **73**:3053-3062.
- Albert MJ, Haridas S, Steer D, Dhaunsi GS, Smith AI & Adler B. 2007. Identification of a *Campylobacter jejuni* Protein That Cross-React with Cholera Toxin. *Infect. Immun.* **6**(75):3070-3073.
- Allison GE & Klaenhammer TR. 1999. Genetics of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria and Their Use in Novel Industrial Applications. In: Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. Atlas RM, Cohen G, Hershberger CL, Hu WS, Sherman DH, Willson RC, and Wu JHD (Eds.). 2th ed. AMS Press. U.S.A.
- Altekruse SF, Stern NJ, Fields PI & Swerdlow DL. 1999. *Campylobacter jejuni*—An Emerging Foodborne Pathogen. *Emerging Infectious Diseases.* **5**:28-35.
- Aquino MHC, Filgueiras ALL, Ferreira MCS, Oliveira SS, Bastos MC & Tibana A. 2002. Antimicrobial resistance and plasmid profiles of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from human and animal sources. *Letters in Appl. Microbiol.* **34**:149-153.
- Arimi SM, Park RWA & Fricker CR. 1990. Study of haemolytic activity of some *Campylobacter* spp. on blood agar plates. *Journal of Applied Bacteriology.* **69**:384-389.
- Ashgar SSA, Oldfield NJ, Wooldridge KG, Jones MA, Irving GJ, Turner DPJ & Ala'Aldeen DAA. 2007. CapA, an Autotransporter Protein of *Campylobacter jejuni*, Mediates Association with Human Epithelial Cells and Colonization of the Chicken Gut. *J. Bacteriol.* **5**(189):1856-1865.
- Atlas RM, Cohen G, Hershberger CLCL, Hu WS, Sherman DH, Willson RC & Wu JHD. (Eds.). 1999. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2th ed. AMS Press. U.S.A.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, & Struhl K. 2002. Short Protocols in Molecular Biology. A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology. 5th ed. Wiley. USA.
- Bacon DJ, Alm RA, Burr DH, Hu L, Kopecko DJ, Ewing CP, Trust TJ & Guerry P. 2000. Involvement of a plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Infect. Immun.* **68**:4384-4390.

- Bacon DJ, Szymanski CM, Burr DH, Silver RP, Alm RA & Guerry P. 2001. A phase – variable capsule is involved in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Molecular Microbiology*. **40**:769-777.
- Baig BH, Wachsmuth K & Morris GK. 1986. Utilization of exogenous siderophores by *Campylobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* **23**:431-433.
- Bang DD, Nielsen EM, Scheutz F, Pedersen K, Handberg K & Madsen M. 2003. PCR detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from Danish pigs and cattle and cytolethal distending toxin production of the isolates. *J. Appl. Microbiol.* **94**:1003-1014.
- Bang DD, Scheutz F, Ahrens P, Pedersen K, Blom J & Madsen M. 2001. Prevalence of cytolethal distending toxin (cdt) genes and CDT production in *Campylobacter* spp. Isolated from Danish broilers. *J. Med. Microbiol.* **50**:19087-1094.
- Begley M, Gahan CG & Hill C. 2005. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**:625–651.
- Bhavsar SP & Kapadnis BP. 2007. Virulence factors of *Campylobacter*. *The Internet Journal of Microbiology*. Volume **3**. Number **2**.
<http://www.ispub.com/ostia/index.php?xmlFilePath=journals/ijmb/vol3n2/campylo.xml>
- Birnboim HC & Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Research*. **7**:1513-153.
- Biswas D, Itoh, K. & Sasakawa, C. 2003. Role of microfilaments and microtubules in the invasion of INT-407 cells by *Campylobacter jejuni*. *Microbiol. Immunol.* **47**:469–473.
- Bok HE, Greeff AS & Crewe-Brown HH. 1991. Incidence of Toxigenic *Campylobacter* Strains in South Africa. *J. Clin. Microbiol.* **6**(29):1262-1264.
- Bradbury WC, Marko MA, Hennessy JN & Penner JL. 1983. Occurrence of Plasmid DNA in Serologically Defined Strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Infect. Immun.* **40**:460-463.
- Brás AM, Chatterjee S, Wren BW, Newell DG & Ketley JM. 1999. A novel *Campylobacter jejuni* two-component regulatory system important for temperature-dependent growth and colonization. *J. Bacteriol.* **181**:3298-3302.
- Caldwell MB, Guerry P, Lee EC, Burans JP & Walker RI. 1985. Reversible expression of flagella in *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* **50**:941-943.
- Carvalho ACT, Ruiz-Palacios GM, Ramos-Cervantes P, Cervantes Le, Jiang X & Pickering LK. 2001. Molecular Characterization of Invasive and Noninvasive *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Isolates. *J. Clin. Microbiol.* **4**(38):1353-1359.

- Carvalho C, Gannon Bw, Halfhide DE, Nicolau A, and Azeredo J. 2008. *In vivo* and *in vitro* evaluation of *Campylobacter* bacteriophages. "Edinburgh International Phage Conference: Book of Abstracts". Edinburgh.
- Chart H, Frost JA, Oza A, Thwaites R, Gillanders S & Rowe B. 1996. Heat-stable serotyping antigens expressed by strains of *Campylobacter jejuni* are probably capsular and not long-chain lipopolysaccharide. J. Appl. Bacteriol. **81**:635-640.
- Chen ML, Ge Z, Fox JG & Schauer DB. 2006. Disruption of Tight Junctions and Induction of Proinflammatory Cytokine Responses in Colonic Epithelial Cells by *Campylobacter jejuni*. Infect. Immun. **12**(74):6581-6589.
- Cloak M, & Fratamico PM. 2002. A Multiplex Polimerase Chain Reaction for the Defferentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from a Swine Processing Facility and Characterization of Isolates by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Antibiotic Resistance Profiles. J. Food Protection. **2**:266-273.
- Coote JG, & Arain T. 1996. A rapid, colourimetric assay for cytotoxin activity in *Campylobacter jejuni*. FEMS Immun. Med. Mucrobiol. **13**:65-70.
- Daikoku T, Kawaguchi M, Takama K & Suzuki S. 1990. Partial Purification and Characterization of the Enterotoxin Produced by *Campylobacter jejuni*. Infect. Immun. **8**(58):2414-2419.
- Datta S, Niwa H & Itoh K. 2003. Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces. J. Med. Microbiol. **52**:345-348.
- De Boer P, Duim B, Rigter A, Van Der Plas J, Jacobs-Reitsma WF & Wagenaar JA. 2000. Computer-Assisted Analysis and Epidemiological Value of Genotyping Methods for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. J. Clin. Microbiol. **5**(38):1940-1946.
- Dé E, Jullien M, Labesse G, Pagès JM, Molle G, & Bolla JM. 2000. MOMP (major outer membrane protein) of *Campylobacter jejuni*; a versatile pore-forming protein. FEBS Letters. **469**:93-97.
- de Melo M & Pechère J-C. 1990. Identification of *Campylobacter jejuni* surface proteins that bind to eucaryotic cells in vitro. Infect. Immun. **58**:1749-1756.
- Doyle MP & Schoeni JL. 1986. Isolation of *Campylobacter jejuni* from retail mushrooms. Appl. Environ. Microbiol. **51**: 449-450.
- Duim B, Vandamme PAR, Rigter AR, Laevens S, Disjkstra JR & Wagenaar JA. 2001. Diferentiation of *Campylobacter* species by AFLP fingerprinting. Microbiology. **147**:2729-2737.
- Duim B, Wassenaar TM, Rigter A & Wagenaar J. 1999. High-Resolution Genotyping of *Campylobacter* strains isolated from poultry and humans with Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprinting. Appl. Environ. Microbiol. **65**:2369-2375.

- Duim BD, Ang CW, van Belkum A, Rigter A, van Leeuwen NWJ, Endtz HP & Wagenaar A. 2000. Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis of *Campylobacter jejuni* Strains Isolated from Chickens and from Patients with Gastroenteritis or Guillain-Barré or Miller Fisher Syndrome. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:3917-3923.
- Eaton KA, Morgan DR & Krakowka S. 1989. *Campylobacter pylori* virulence factors in gnotobiotic piglets. *Infect. Immun.* **57**:1119-1125.
- Edgeworth JD. 2005. Bacterial gastroenteritis. *Gastrointestinal Infections*. The Medicine Publishing Company. London, UK. *Medicine*. **33**:73-77.
- Elliot WH. 1985. Metabolism of bile acids in liver and extrahepatic tissues, p. 3003–3329. In: Danielsson H & Sjovall J. (ed.). *Sterols and bile acids*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands.
- Elvers KT & Park SF. 2002. Quorum sensing in *Campylobacter jejuni*: detection of a *luxS* encoded signaling molecule. *Microbiology*. **148**:1475-1481.
- Endtz HP, Ang CW, van den Braak N, Duim B, Rigter A, Price LJ, Woodward DL, Rodgers FG, Johnson WM, Wagenaar JA, Jacobs BC, Verbrugh HA & van Belkum A. 2000. Molecular characterization of *Campylobacter jejuni* from patients with Guillain-Barré and Miller Fisher Syndromes. *J. Clin. Microbiol.* **38**:2297-2301.
- Evans DG, Silver RP, Evans DJ, Chase DG & Gorbach SL. 1975. Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in *Escherichia coli* enterotoxigenic for humans. *Infect. Immun.* **12**:656-667.
- Everest PH, Cole AT, Hawkey CJ, Knutton S, Goossens H, Butzler JP, Ketley JM & Williams PH. 1993. Roles of leukotriene B₄, prostaglandin E₂, and Cyclic AMP in *Campylobacter jejuni*-induced intestinal fluid secretion. *Infect. Immun.* **61**:4885-4887.
- Eyigor A, Dawson KA, Langlois BE & Pickett CL. 1999a. Cytolethal distending toxin genes in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates: detection and analysis by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **37**:1646–1650.
- Eyigor A, Dawson KA, Langlois BE & Pickett CL. 1999b. Detection of Cytolethal Distending Toxin Activity and *cdt* genes in *Campylobacter* spp. Isolated from chicken carcasses. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1501-1505.
- Farnell MB, Donoghue AM, Cole K, Reyes-Herrera I, Blore PJ & Donoghue DJ. 2005. *Campylobacter* susceptibility to ciprofloxacin and corresponding fluoroquinolone concentrations within the gastrointestinal tracts of chickens. *J. Appl. Microbiol.* **99**:1043-1050.
- Ferrero RL & Lee A. 1988. Motility of *Campylobacter jejuni* in a viscous environment: Comparison with conventional rod-shaped bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **1**(134):53-59.
- Fletcher RD, Albers AC, Chen AK & Albertson JN. 1983. Ascorbic Acid Inhibition of *Campylobacter jejuni* growth. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**:792-795.

Fouts DE, Mongodin EF, Mandrell RE, Miller WG, Rasko DA, et al. 2005. Major structural differences and novel potential virulence mechanisms from the genomes of multiply *Campylobacter* species. *PloS Biol.* **3**:e15.

Fricker CR, Alemohammad MM, Spencer S & Park RWA. 1985 The application of new and established tests to characterize unusual campylobacters isolated from man, animals and the environment. In: *Campylobacter*. III ed. Pearson AD, Skirrow MB, Lior H & Rowe B. pp. 224-225. London: Public Health Laboratory Service.

Friedman CR, Hoekstra RM, Samuel M, Marcus R, Bender J, Shiferaw B, Reddy S, Ahuja SD, Helfrick DL, Hardnett F, Carter M, Anderson B & Tauxe RV. 2004. Risk Factors for Sporadic *Campylobacter* Infection in the United States: A Case-Control Study in FoodNet Sites. *Clinical Infectious Diseases*. **38**(Suppl 3):S285-96.

Friis LM, Pearson BM & Wells JM. 2005. *In vitro* cell culture methods for investigating *Campylobacter* invasion mechanisms. *Journal of Microbiological Methods*. **61**:145-160.

Frost JA, Oza AN, Thwaites RT & Rowe B. 1998. Serotyping scheme for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* based on direct agglutination of Heat-Stable Antigens. *J. Clin. Microbiol.* **36**:335-339.

Fry BN, Feng S, Chen Y-Y, Newell DG, Coloe PJ & Korolik V. 2000. The *galE* gene of *Campylobacter jejuni* is involved in lipopolysaccharide synthesis and virulence. *Infect. Immun.* **68**:2594-2601.

Gaudreau C & Gilbert H. 1997. Comparison of disc diffusion and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **39**:707-712.

Gaynor EC, Cawthraw S, Manning G, MacKichan JK, Falkow S & Newell G. 2004. The genome-sequenced variant of *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 and the original clonal clinic isolate differ markedly in colonization, gene expression, and virulence-associated phenotypes. *J. Bacteriol.* **186**:503-517.

Gaynor EC, Ghorri N & Falkow S. 2001. Bile-induced 'pili' in *Campylobacter jejuni* are bacteria-independent artifacts of the culture medium. *Mol. Microbiol.* **39**:1546-1549.

Gaynor EC, Wells DH, MacKichan JK & Falkow S. 2005. The *Campylobacter jejuni* stringent response controls specific stress survival and virulence-associated phenotypes. *Mol. Microbiol.* **56**:8-27.

Gilbert M, Karwaski MF, Bernatchez S, Young NM, Taboada E, Michniewicz J, Cunningham A-M & Wakarchuk WW. 2002. The genetic bases for the variation in the lipo-oligosaccharide of the mucosal pathogen, *Campylobacter jejuni*. *The Journal of Biological Chemistry*. **277**:327-337.

Giriboni De Mello II. 2002. FACTORS AFFECTING GROWTH AND CULTURING OF *Campylobacter jejuni*. Thesis (PhD). UNIVERSITY OF FLORIDA.

- Godschalk PCR, van Belkum A, van den Braak N, van Netten D, Ang CW, Jacobs BC, Gilbert M & Endtz HP. 2007. PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of *Campylobacter jejuni* Genes Involved in Lipooligosaccharide Biosynthesis Identifies Putative Molecular Markers for Guillain-Barré Syndrome. *J. Clin. Microbiol.* **7**(45):2316-2320.
- González A, Chico P, Arzate P, Rodríguez M, Mckhann M, Lobato C, Nachamkin I, Domínguez W, Lombardo E, Mancebo A, Ruíz m, Dávila G, y García MA. 2006. Epidemiología del síndrome de Guillain-Barré asociado a *Campylobacter jejuni* en el INP. *Acta Pediátrica de México.* **27**(5):300-3.
- Gonzalez I, Grant KA, Richardson PT, Park SF & Collins MD. 1997. Specific Identification of the Enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by Using a PCR Test Based on the *ceuE* Gene Encoding a Putative Virulence Determinant. *J. Clin. Microbiol.* **3**(35):759-763.
- Goon S, Ewing CP, Lorenzo M, Pattarini D, Majam G, and Guerry P. 2006. A σ^{28} -Regulated Nonflagella Gene Contributes to Virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Infect. Immun.* **74**:769-772.
- Grant CCR, Konkel ME, Cieplak W & Tompkins LS. 1993. Role of Flagella in Adherence, Internalization, and Translocation of *Campylobacter jejuni* in Nonpolarized and Polarized Epithelial Cell Cultures. *Infect. Immun.* **5**(61):1764-1771.
- Grant KA, Belandia IU, Dekker N, Richardson PT & Park SF. 1997. Molecular Characterization of *pldA*, the Structural Gene for a Phospholipase A from *Campylobacter coli*, and Its Contribution to Cell-Associated Hemolysis. *Infect. Immun.* **4**(65):1172-1180.
- Greenberg EP & Canale-Parola E. 1977. Motility of flagellated bacteria in viscous environments. *J. Bacteriol.* **132**:356-358.
- Guerrero ML, Morrow RC, Calva JJ, Ortega-Gallegos H, Weller SC, Ruiz-Palacios GM & Morrow AL. 1999. Rapid ethnographic assessment of breastfeeding practices in periurban Mexico City. *Bulletin of the World Health Organization. World Health Organization.* **77**(4):323-330.
- Guerry P, Ewin CP, Schirm M, Lorenzo M, Kelly J, Pattarini D, Majam G, Thibault P, and Logan S. 2006. Changes in flagellin glycosilation affect *Campylobacter* autoagglutination and virulence. *Mol. Microbiol.* **60**:299-311.
- Guerry P, Logan SM, Thornton S & Trust TJ. 1990. Genomic Organization and Expression of *Campylobacter* Flagellin Genes. *J. Bacteriol.* **172**:1853-1860.
- Gupta S & Chowdhury R. 1997. Bile affects production of virulence factors and motility of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* **65**:1131-1134.
- Hale TL, Morris RE & Bonventre PF. 1979. Shigella infection on Henle Intestinal Epitelial Cells: role of the host cell. *Infect. Immun.* **24**:887-894.

- Hassane DC, Lee RB, & Pickett CL. 2003. *Campylobacter jejuni* Cytolethal Distending Toxin Promotes DNA Repair Responses in Normal Human Cells. *Infect. Immun.* **71**:541-545.
- Hazeleger WC, Wouters JA, Rombouts FM & Abee T. 1998. Physiological activity on *Campylobacter jejuni* far below the minimal growth temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3917-3922.
- Hendrixson DR & DiRita VJ. 2004. Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in commensal colonization of the chick gastrointestinal tract. *Mol. Microbiol.* **52**:471-484.
- Hickey TE, Baqar S, Bourgeois AL, Ewind CP & Guerry P. 1999. *Campylobacter jejuni*-stimulated secretion of Interleukin-8 by INT407 cells. *Infect. Immun.* **67**:88-93.
- Hickey TE, Majam G & Guerry P. 2005. Intracellular Survival of *Campylobacter jejuni* in Human Monocytic Cells and Induction of Apoptotic Death by Cytolethal Distending Toxin. *Infect. Immun.* **8**(73):5194-5197.
- Hickey TE, McVeigh AL, Scott DA, Michielutti RE, Bixby A, Carroll SA, Bourgeois AL & Guerry P. 2000. *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin mediates release of interleukin-8 from intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* **68**:6535–6541.
- Hofreuter D, Tsai J, Watson RO, Novik V, Altman B, Benitez M, Clark C, Perbost C, Jarvie T, Du L & Galán JE. 2006. Unique Features of a Highly Pathogenic *Campylobacter jejuni* Strain. *Infect. Immun.* **8**(74):4694-4707.
- Holmes K, Mulholland F, Pearson BM, Pin C, McNicholl-Kennedy J, Ketley JM & Wells JM. 2005. *Campylobacter jejuni* gene expression in response to iron limitation and the role of Fur. *Microbiology.* **151**:243-257.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT & Williams ST. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Williams & Wilkins. USA.
- Hopkins KL, Desai MD, Frost JA, Stanley J & Logan JMJ. 2004. Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism Genotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains and its relation with host specificity, serotyping, and phage typing. *J. Clin. Microbiol.* **42**:229-235.
- Hossain A, Stewart-Tull DES & Freer JH. 1993. Heat-labile and heat-stable haemolysins of *Campylobacter jejuni*. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* **6**(4):331-339.
- Hu L & Kopecko DJ. 1999. *Campylobacter jejuni* 81-176 Associates with Microtubules and Dynein during Invasion of Human Intestinal Cells. *Infect. Immun.* **67**: 4171–4182.
- Hugdahl MB, Beery JT & Doyle MP. 1988. Chemotactic behavior of *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* **56**:1560-1566.
- Inglis GD & Kalischuk LD. 2003. Use of PCR for Direct Detection of *Campylobacter* Species in Bovine Feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **6**(69):3435-3447.

- Iovine NM, Pursnani S, Voldman A, Wasserman G, Blaser MJ & Weinrauch Y. 2008. Reactive Nitrogen Species Contribute to Innate Host Defense against *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* **3**(76):986-993.
- Ishakawa T, Mizunoe Y, Kawabata S-i, Takade A, Harada M, Wai SN & Yoshida S-i. 2003. The iron-binding protein Dps confers hydrogen peroxide stress resistance to *Campylobacter jejuni*. *J. Bacteriol.* **185**:1010-1017.
- Istivan TS, Coloe PJ, Fry BN, Ward P, and Smith SC. 2004. Characterization of a haemolytic phospholipase A₂ activity in clinical isolates of *Campylobacter concisus*. *J. Med. Microbiol.* **53**:483-493.
- Johanesen PA & Dwinell MB. 2006. Flagellin-Independent Regulation of Chemokine Host Defense in *Campylobacter jejuni*-Infected Intestinal Epithelium. *Infect. Immun.* Vol. 74. **6**: 3437–3447.
- Johnson WM & Lior H. 1987. Response of Chinese hamster ovary cells to a cytolethal distending toxin (CDT) of *Escherichia coli* and possible misinterpretation as heat-labile (LT) enterotoxin. *FEMS Microbiol. Lett.* **43**:19-23.
- Johnson WM & Lior H. 1988. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* spp. *Microb. Pathog.* **4**:115–126.
- Joshua GW, Guthrie-Irons C, Karlyshev AV & Wren BW. 2006. Biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. *Microbiology.* **152**:387-396.
- Kaldor J & Speed BR. 1984. Guillain-Barré syndrome and *Campylobacter jejuni*: a serological study. *British Medical Journal.* **288**:1867-1870.
- Karlyshev AV & Wren BW. 2001. Detection and initial characterization of novel capsular polysaccharide among diverse *Campylobacter jejuni* strains using alcian blue dye. *J. Clin. Microbiol.* **39**:279-284.
- Karlyshev AV, Linton D, Gregson NA & Wren BW. 2002. A novel paralogous gene family involved in phase-variable flagella-mediated motility in *Campylobacter jejuni*. *Microbiology.* **148**:473-480.
- Karlyshev AV, Linton D, Gregson NA, Lastovica AJ & Wren BW. 2000. Genetic and biochemical evidence of a *Campylobacter jejuni* polysaccharide that accounts for Penner serotype specificity. *Mol. Microbiol.* **35**:529-541.
- Karlyshev AV, McCrossan MV & Wren BW. 2001. Demonstration of Polysaccharide capsule in *Campylobacter jejuni* using Electron Microscopy. *Infect. Immun.* **69**:5921-5924.
- Ketley JM & Konkel ME (Eds.) 2005. *CAMPYLOBACTER* Molecular and Cellular Biology. Horizon Bioscience. Great Britain.
- Ketley JM. 1997. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Microbiology.* **143**:5–21.

- Keyer K, Gort AS & Imlay JA. 1995. Superoxide and the production of oxidative DNA damage. *J. Bacteriol.* **177**:6782–6790.
- Klena J. 2001. A Survey of Phenotypic and Genetic Methods Used to Identify and Differentiate Thermotolerant *Campylobacter* spp. Strains. Ministry of Health. New Zealand. <http://www.moh.govt.nz>
- Klena JD, Parker CT, Knibb K, Claire Ibbitt J, Devane PML, Horn ST, Miller WG & Konkel ME. 2004. Differentiation of *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, and *Campylobacter upsaliensis* by a Multiplex PCR Developed from the Nucleotide Sequence of the Lipid A Gene *lpxA*. *J. Clin. Microbiol.* **12**(42):5549-5557.
- Kodaka H, Armfield AY, Lombard DL & Dowell VR Jr. 1982. Practical procedure for demonstrating bacterial flagella. *J. Clin. Microbiol.* **16**:948-952.
- Konkel ME & Joens LA. 1989. Adhesion to and Invasion of HEP-2 by *Campylobacter* spp. *Infection and Immunity.* **57**:2984-2990.
- Konkel ME & Joens LA. 1990. Effect of enterovirus on adherence to and invasion of HEP-2 cells by *Campylobacter* isolates. *Infect. Immun.* **58**:1101-1105.
- Konkel ME, Kim BJ, Klena JD, Young CR & Ziprin R. 1998. Characterization of the thermal stress response of *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* **66**:3666-3672.
- Konkel ME, Kim BJ, Rivera-Amill V & Garvis SG. 1999. Bacterial secreted proteins are required for the internalization of *Campylobacter jejuni* into cultured mammalian cells. *Mol. Microbiol.* **32**:691-701.
- Konkel ME, Klena JD, Rivera-Amill V, Monteville MR, Biswas D, Raphael B & Mickelson J. 2004. Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus. *J. Bacteriol.* **186**:3296-3303.
- Kopecko D, Hu L & Zaal KJM. 2001. *Campylobacter jejuni* – microtubule – dependent invasion. *TRENDS in Microbiology.* **9**:389-396.
- Lastovica AJ, Shi F & Fry BN. 2003. Molecular typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Clin. Microbiol.* **41**:1349-1350.
- Leon-Kempis MR, Guccione E, Mulholland F, Williamson MP, & Kelly DJ. 2006 .The *Campylobacter jejuni* PEB1a adhesion is an aspartate/glutamate-binding protein of an ABC transporter essential for microaerobic growth on dicarboxylic amino acids. *Mol. Microbiol.* **60**:1262-1275.
- Lindholm GB, Johny M, Khalil K, Mazhar K, Ruiz-Palacios GM & Kaijser B. 1989. Enterotoxigenicity and frequency of *Campylobacter jejuni*, *C. coli* and *C. laridis* in human and animal stool isolates from different countries. *FEMS Microbiology Letters.* Vol 66 Issue 1-3, pp 163–167.

- Linton C, Lawson AJ, Owen RJ & Stanley J. 1997. PCR Detection, Identification to Species Level, and Fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Direct from Diarrheic Samples. J. Clin. Microbiol. **10**(35):2568-2572.
- Lior H & Patel A. 1987. Improved Toluidine Blue-DNA Agar for detection of DNA hydrolysis by Campylobacters. J. Clin. Microbiol. **25**:2030-2031.
- Liu K, Fry BN & Coloe PJ. 2007. Isolation of a gene that is involved in *Campylobacter jejuni* 81116 cytotoxin activation. FEMS Immun. Med. Microbiol. **49**:133-140.
- Logan SM, Harris LA & Trust TJ. 1987. Isolation and characterization of *Campylobacter* flagellins. J. Bacteriol. **169**:5072-5077.
- Louwen RPL, Belkum AV, Wagennar JA, Doorduyn Y, Achterberg R & Endtz HP. 2006. Lack of Association between the Presence of the *pVir* Plasmid and Bloody Diarrhea in *Campylobacter jejuni* Enteritis. J. Clin. Microbiol. **44**:1867-1868.
- Luquero FJ, Padilla ES, Eiros JM, Domínguez M, González G, Gobernado C, Bachiller R, Castrodeza JJ & de Lejarazu RO. 2007. TENDENCIA Y VARIACIONES ESTACIONALES DE LAS GASTROENTERITIS POR *CAMPYLOBACTER* EN VALLADOLID. SERIE DE CINCO AÑOS: 2000-2004. Rev. Esp. Salud Pública. **3**(81):319-326.
- Lux R & Shi W. 2004. Chemotaxis-Guided Movements in Bacteria. Crit. Rev. Biol. Med. **4**:207-220.
- MacCallum A, Haddock G & Everest PH. 2005. *Campylobacter jejuni* activates mitogen-activated protein kinases in Caco-2 cell monolayers and *in vitro* infected primary human colonic tissue. Microbiology. **151**:2765-2772.
- MacCallum A, Hardy SP & Everest PH. 2005. *Campylobacter jejuni* inhibits the absorptive transport functions of Caco-2 cells and disrupts cellular tight junctions. Microbiology. **151**:2451-2458.
- Madigan MT & Martinko JM. 2006. Brock Biology of Microorganisms. 11th ed. Pearson Prentice Hall. USA.
- Mahajan S & Rodgers FG. 1990. Isolation, characterization, and host-cell-binding properties of a cytotoxin from *Campylobacter jejuni*. J. Clin. Microbiol. **28**:1314-1320.
- Malik-Kale P, Parker CT & Konkel. 2008. Culture of *Campylobacter jejuni* with Sodium Deoxycholate Induces Virulence Gene Expression. J. Bacteriol. **7**(190):2286-2297.
- Marmur J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. J. Mol. Biol. **3**:208-18.
- Martínez-Cuesta MC, Kok J, Herranz E, Peláez C, Requena T & Buist G. 2000. Requirement of Autolytic Activity for Bacteriocin-Induced Lysis. Appl. Environ. Microbiol. **66**:3174-3179.

- Mayr-Harting A, Hedges AJ & Berkeley RC. 1972. Methods for Studing Bacteriocins. In: *METHODS IN MICROBIOLOGY*. Norris, J. R. & D. W. Ribbons (Ed.) Vol. 7A. Academic Press. pp. 315-421.
- McCardell BA, Madden JM & Stanfield JT. 1986. Production of cytotoxins by *Campylobacter*. Lancet i:1031.
- Métris A, George SM & Baranyi J. 2006. Use of optical density detection times to assess the effect of acetic acid on single-cell kinetics. Appl. Environ. Microbiol. **72**:6674-6679.
- Miller Jf, Dower Wj & Tompkins LS. 1988. High-voltage electroporation of bacteria: Genetic transformation of *Campylobacter jejuni* with plasmid DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **85**:856-860.
- Misawa N, Hirayama K, Itoh K & Takahashi E. 1995. Detection of alfa- and beta-hemolytic-like activity from *Campylobacter jejuni*. J. Clin. Microbiol. **33**:729-731.
- Montaño-Peréz K y Vargas-Albores F. 2002. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS: UN MECANISMO DE DEFENSA ANCESTRAL CON MUCHO FUTURO. INTERCIENCIA. **27**:21-27.
- Monteville MR, Yoon JE & Konkel ME. 2003. Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by *Campylobacter jejuni* requires the CadF outer-membrane protein and microfilament reorganization. Microbiology. **149**:153–165.
- Mooney A, Byrne C, Clyne M, Johnson-Henry K, Sherman P & Bourke B. 2003. Invasion of human epithelial cells by *Campylobacter upsaliensis*. Cellular Microbiology. **5**:835-847.
- Nachamkin I, Allos BM & Ho T. 1998. *Campylobacter* species and Guillain-Barré Syndrome. Clin. Microbiol. Rev. **11**:555-567.
- Nachamkin I, Bohachick K & Patton CM. 1993. Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. J. Clin. Microbiol. **31**:1531-1536.
- Nachamkin I, Yang X-E & Stern NJ. 1993. Role of *Campylobacter jejuni* flagella as colonization factors for three-day-old chicks: analysis with flagellar mutants. Appl. Environ. Microbiol. **59**:1269-1273.
- Nadeau E, Messier S & Quessy S. 2003. Comparison of *Campylobacter* Isolates from Poultry and Humans: Association between *In Vitro* Virulence Properties, Biotypes, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis Clusters. Appl. Environ. Microbiol. **10**:6316-6320.
- Nakari UM, Laaksonen K, Korkeila M & Siitonen A. 2005. Comparative typing of *Campylobacter jejuni* by heat-stable serotyping and PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis. J. Clin. Microbiol. **43**:1166-1170.
- Nichols GL. 2005. Fly Transmission of *Campylobacter*. Emerging Infectious Diseases. **3**(11):361-364. www.cdc.gov/eid

- Nuijten PJM, Bartles C, Bluemink-Pluym NMC, Gaastra W & van der Zeijst BAM. 1990. Size and physical map of the *Campylobacter jejuni* chromosome. Nucleic Acid Research. **18**:6211-6214.
- Nuijten PJM, Bluemink-Pluym NMC, Gaastra W & van der Zeijst BAM. 1989. Flagellin expression in *Campylobacter jejuni* is regulated at the transcriptional level. Infect. Immun. **57**:1084-1088.
- Nuijten PJM, van Asten FJAM, Gaastra W & van der Zeijst BAM. 1990. Structural and functional analysis of two *Campylobacter jejuni* flagellin genes. The Journal of Biological Chemistry. **265**:17798-17804.
- Oberhelman RA & Taylor DN. *Campylobacter* Infections in Developing Countries. In: Nachamkin I & Blaser MJ (Eds.). 2000. *Campylobacter*. 2nd Ed. ASM. Washington. Chapter 7.
- Oelschlaeger TA, Guerry P, & Kopecko DJ. 1993. Unusual microtubule-dependent endocytosis mechanisms triggered by *Campylobacter jejuni* and *Citrobacter freundii*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**:6884-6888.
- Olive AJ, Kenjale R, Espina M, Moore DS, Picking WL & Picking WD. 2007. Bile salts stimulate recruitment of IpaB to the *Shigella flexneri* surface, where it colocalizes with IpaD at the tip of the type III secretion needle. Infect. Immun. **75**:2626-2629.
- Oliveira TCRM, Barbut S & Griffiths MW. 2005. A robotic DAN purification protocol and real-time PCR for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods. J. Food Prod. **68**:2131-2135.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS) 2005. Informe anual de la Red de Monitoreo/Vigilancia de Resistencia a los Antibióticos 2004. Organización Mundial de la Salud. Brasil.
- Osawa R & Yamai S. 1996. Production of thermostable direct hemolysin by *Vibrio parahaemolyticus* enhanced by conjugated bile acids. Appl. Environ. Microbiol. **62**:3023-3025.
- Osawa R, Arakawa E, Okitsu T, Yamai S & Watanabe H. 2002. Levels of thermostable direct hemolysin produced by *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 and other serovars grown anaerobically with the presence of a bile acid. Curr. Microbiol. **44**:302-305.
- Oyofa BA, Thornton SA, Burr DH, Trust TJ, Pavlovskis OR & Guerry P. 1992. Specific Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by Using Polymerase Chain Reaction. J. Clin. Microbiol. **10**(30):2613-2619.
- Pace JL, Chai TJ, Rossi HA & Jiang X. 1997. Effect of bile on *Vibrio parahaemolyticus*. Appl. Environ. Microbiol. **63**:2372-2377.
- Palyada K, Threadgill D & Stintzi A. 2004. Iron Acquisition and Regulation in *Campylobacter jejuni*. J. Bacteriol. **186**:4714-4729.

- Park SF & Richardson PT. 1995. Molecular Characterization of a *Campylobacter jejuni* Lipoprotein with Homology to Periplasmic Siderophore-Binding Proteins. *J. Bacteriol.* **9**(177):2259-2264.
- Parkhill J, Wren BW, Mungall K, Ketley JM, Churcher C, Basham D, Chillingworth T, Davies RM, Feltwell T, Holroyd S, Jagels K, Karlyshev AV, Moule S, Pallen MJ, Penn CW, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, van Vliet AH, Whitehead S & Barrell BG. 2000. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature.* **403**:665–668.
- Paster BJ & Gibbons RJ. 1986. Chemotactic response to formate by *Campylobacter concisus* and its potential role in gingival colonization. *Infect. Immun.* **52**:378-383.
- Pearson BM, Pin C, Wright J, I'Anson K, Humphrey T & Wells JM. 2003. Comparative genome analysis of *Campylobacter jejuni* using whole genome DNA microarrays. *FEBS Letters.* **554**:224-230.
- Pei Z & Blaser MJ. 1993. PEB1, the Major Cell binding Factor of *Campylobacter jejuni*, Is a Homolog of the Binding Component in Gram-negative Nutrient Transport Systems. *J. Biol. Chem.* **268**:18717-18725.
- Pei Z, Ellison RT, & Blaser MJ. 1991. Identification, Purification, and Characterization of Major Antigenic Proteins of *Campylobacter jejuni*. *J. Biol. Chem.* **266**:16363-16369.
- Penn CW. 2001. Surface components of *Campylobacter* and *Helicobacter*. *J. Appl. Microbiol.* **90**:25S-35S.
- Penner JL & Hennessy JN. 1980. Passive hemagglutination technique for serotyping *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* on the basis of soluble heat-stable antigens. *J. Clin. Microbiol.* **12**:732-737.
- Pickett CL & Lee RB. 2005. Cytolethal Distending Toxin. In: Ketley, J. M. & M E. Konkel (Eds.) *CAMPYLOBACTER Molecular and Cellular Biology*. Horizon Bioscience. Great Britain. pp 385-394.
- Pickett CL, Auffenberg T, Pesci EC, Sheen VL & Jusuf SD. 1992. Iron Acquisition and Hemolysin Production by *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* **60**:3872-3877.
- Pickett CL, Cottle DL, Pesci EC & Bikah G. 1994. Cloning, sequencing, and expression of the *Escherichia coli* cytolethal distending toxin genes. *Infect. Immun.* **62**:1046–1051.
- Pickett CL, Pesci EC, Cottle DL, Russell G, Erdem AN & Zeytin H. 1996. Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* sp. *cdtB* genes. *Infect. Immun.* **64**:2070–2078.
- Poly F, Ewing C, Goon S, Hickey TE, Rockabrand D, Majam G, Lee L, Phan J, Savarino NJ & Guerry P. 2007. Heterogeneity of a *Campylobacter jejuni* Protein That Is Secreted through the Flagellar Filament. *Infect. Immun.* **8**(75):3859-3867.

- Prouty AM & Gunn JS. 2000. *Salmonella enterica* serovar typhimurium invasion is repressed in the presence of bile. *Infect. Immun.* **68**:6763–6769.
- Prouty AM, Brodsky IE, Falkow S & Gunn JS. 2004a. Bile-salt-mediated induction of antimicrobial and bile resistance in *Salmonella typhimurium*. *Microbiology.* **150**:775–783.
- Prouty AM, Brodsky IE, Manos J, Belas R, Falkow S & Gunn JS. 2004b. Transcriptional regulation of *Salmonella enterica* serovar typhimurium genes by bile. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **41**:177–185.
- Purdy D, Buswell CM, Hodgson AE, McAlpine K, Henderson I & Leach SA. 2000. Characterization of cytolethal distending toxin (CDT) mutants of *Campylobacter jejuni*. *J. Med. Microbiol.* **49**:473–479.
- Purdy D, Cawthraw S, Dickinson JH, Newell DG & Park SF. 1999. Generation of a superoxide dismutase (SOD)-deficient mutant of *Campylobacter coli*: evidence for the significance of SOD in *Campylobacter* survival and colonization. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:2540–2546.
- Rautelin HI & Kosunen TU. 1987. *Campylobacter* etiology in human gastroenteritis demonstrated by antibodies to acid extract antigen. *J. Clin. Microbiol.* **25**:1944–1951.
- Richardson PT & Park SF. 1995. Enterochelin acquisition in *Campylobacter coli*: characterization of components of a binding-protein-dependent transport system. *Microbiology.* **141**:3181–3191.
- Richardson PT & Park SF. 1998. Molecular characterization of a strain-specific sequence in *Campylobacter jejuni*. *Letters in Appl. Microbiol.* **26**:113–117.
- Ridley KA, Rock JD, Li Y & Ketley JM. 2006. Heme Utilization in *Campylobacter jejuni*. *J. Bacteriol.* **188**:7862–7875.
- Rivoal K, Denis M, Salvat G, Colin P & Ermel G. 1999. Molecular characterization of the diversity of *Campylobacter* spp. Isolates collected from a poultry slaughterhouse: analysis of cross-contamination. *Letters in Appl. Microbiol.* **29**:370–374.
- Rozynek E, Dzierzanowska-Fangrat K, Joswiak P, Popowski J, Korsak D & Dzierzanowska D. 2005. Prevalence of potential virulence markers in Polish *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates obtained from hospitalized children and from chicken carcasses. *J. Med. Microbiol.* **54**:615–619.
- Ruiz-Palacios GM, Calva JJ, Pickering LK, Lopez-Vidal Y, Volkow P, Pezzarossi H & West MS. 1990. Protection of breast-fed infants against *Campylobacter* diarrhea by antibodies in human milk. *J. Pediatr.* **116**(5):707–13.
- Ruiz-Palacios GM, Cervantes LE, Ramos P, Chavez-Munguia B & Newburg DS. 2003. *Campylobacter jejuni* Binds Intestinal H(O) Antigen (Fuc α 1, 2Gal β 1, 4GlcNAc), and Fucosyloligosaccharides of Human Milk Inhibit Its Binding and Infection. *J. Biol. Chem.* **16**(278):14112–14120.

Ruiz-Palacios GM, Escamilla E & Torres N. 1981. Experimental *Campylobacter* Diarrhea in Chickens. *Infect. Immun.* **1**(34):250-255.

Russell RG & Blake DC Jr. 1994. Cell association and invasion of Caco-2 by *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* **62**:3773-3779.

Sambrook J & Russel WJ. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

Sansonetti PJ, Ryter A, Clerc P, Maurelli AT & Mounier J. 1986. Multiplication of *Shigella flexneri* within HeLa cells: lysis of the phagocytic vacuole and plasmid-mediated contact hemolysis. *Infect. Immun.* **51**:461-469.

Saunders NJ, Moxon ER & Gravenor MB. 2003. Mutation rates: estimating phase variation rates when fitness are present and their impact on population structure. *Microbiology.* **149**:485-495.

Schneider WR & Doetsch RN. 1974. Effect of Viscosity on Bacterial Motility. *J. Bacteriol.* **117**:696-701.

Schouls LM, Reulen S, Duim B, Wagenaar JA, Willems RJL, Dingle KE, Colles FM & Embden JDA. 2003. Comparative genotyping of *Campylobacter jejuni* by Amplified Fragment Length Polymorphism, multilocus sequence typing, and short repeat sequencing: strain diversity, host range, and recombination. *J. Clin. Microbiol.* **41**:15-26.

Schuhmacher DA & Klose KE. 1999. Environmental signals modulate ToxT-dependent virulence factor expression in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **181**:1508-1514.

Secretaria de Salud. 2006. Información Epidemiológica de Morbilidad 2005 (versión ejecutiva). 1^a ed. Secretaria de Salud. Dirección General de Epidemiología. México. www.salud.gob.mx

Shi F, Chen YY, Wassenaar TM, Woods WH, Coloe PJ & Fry BN. 2002. Development and application of a new scheme for typing *Campylobacter jejuni* by PCR-based Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *J. Clin. Microbiol.* **40**:1791-1797.

Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL & Zervos MJ. 2006. Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**:512-530.

Song YC, Jin S, Louie H, Ng D, Lau R, Zhang Y, Weerasekera R, Al Rashid S, Ward LA, Der SD & Chan VL. 2004. FlaC, a protein of *Campylobacter jejuni* TGH9011 (ATCC43431) secreted through the flagellar apparatus, binds epithelial cells and influences cell invasion. *Mol. Microbiol.* **53**: 541-553.

Stern NJ, Stevoh EA, Eruslanov BV, Perelygin VV, Mitsevich EV, Mitsevich IP, Pokhilenko VD, Levchuk VP, Svetoch OE & Seal BS. 2006. Isolation of a *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal system. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:2111-3116.

- Strid MA, Engberg J, Larsen EB, Bergtrup K, MØlbak K & Krogfelt A. 2001. Antibody responses to *Campylobacter* infections determined by an enzyme-linked immunosorbent assay: 2-year follow-up study of 210 patients. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. **8**:314-319.
- Szymanski CM, King M, Haardt M & Armstrong GD. 1995. *Campylobacter jejuni* motility and invasion of Caco-2 cells. *Infect. Immun.* **63**:4295-4300.
- Taboada EN, van Belkum AF, Yuki N, Acedillo RR, Godschalk PCR, Koga M, Endtz HP, Gilbert M & Nash JHE. 2007. Comparative genomic analysis of *Campylobacter jejuni* associated with Guillain-Barre and Miller Fisher syndromes: neuropathogenic and enteritis-associated isolates can share high levels of genomic similarity. *BMC Genomics*. **8**:359 doi:10.1186/1471-2164-8-359.
- Takata T, Fujimoto S & Amako K. 1992. Isolation of Nonchemotactic Mutants of *Campylobacter jejuni* and Their Colonization of the Mouse Intestinal Tract. *Infect. Immun.* Vol. 60. **9**:3596-3600.
- Tashiro S, Wlater J, Shinohara A, Kamada N & Cremer T. 2000. Rad51 Accumulation at Sites of DNA Damage and in Postreplicative Chromatin. *J. Cel. Biol.* **150**:283-291.
- Tauxe RE. 1992. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. In: *Campylobacter jejuni: current status and future trends*. Nachamkin I, Blaser MJ & Tompkins LS (eds.) American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp. 9–19.
- Tay ST, Devi S, Puthucheary S & Kautner IM. 1995. Detection of haemolytic activity of *Campylobacter* by agarose haemolysis and microplate assay. *J. Med. Microbiol.* **42**:175–180.
- Taylor DE & Tracz DM. 2005. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Campylobacter*. In: *CAMPYLOBACTER Molecular and Cellular Biology*. Ketley JM, & Konkel ME (Eds.) Horizon Bioscience. Great Britain. pp. 193-204.
- Taylor DE, de Grandis SA, Karmali MA & Fleming PC. 1981. Transmissible plasmids from *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **19**:831-835.
- Taylor DE, Garner RS & Allan BJ. 1983. Characterization of tetracycline resistance plasmids from *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **24**:930-935.
- Tenover FC, Bronsdon MA, Gordon KP & Plorde JJ. 1983. Isolation of plasmids encoding tetracycline resistance from *Campylobacter jejuni* strains isolated from simians. *Antimicrob. Agents Chemother.* **23**:320-322.
- Thomas C, Hill DJ & Mabey M. 1999. Morphological changes of synchronized *Campylobacter jejuni* populations during growth in single phase liquid culture. *Letters in Appl. Microbiol.* **28**:194-198.

- Tracz DM, Keelan M, Ahmed-Bentley J, Gibreel A, Kowalewska-Grochowska K & Taylor DE. 2005. *pVir* and bloody diarrhea in *Campylobacter jejuni* enteritis. Research. **11**:838-843.
- Unicomb LE, Dalton CB, Gilbert GL, Becker NG, and Patel MS. 2008. Age-Specific Risk Factors for Sporadic *Campylobacter* Infection in Regional Australia. Foodborne Pathogens and Disease. **5**:79-85.
- van Alphen LB, Bleumink-Pluym NM, Rochat KD, van Balkom BWM, Wösten MMS, and van Putten JPM. 2008. Active migration into the subcellular space precedes *Campylobacter jejuni* invasion of epithelial cells. Cellular Microbiology. **10**:53-66.
- van Vliet AHM & Ketley JM. 2001. Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. J. Appl. Microbiol. **90**:45S-56S.
- van Vliet AHM, Wooldridge KG & Ketley JM. 1998. Iron-responsive gene regulation in a *Campylobacter jejuni* fur mutant. J. Bacteriol. **180**:5291-5298.
- Wang Y & Taylor DE. 1990. Natural transformation in *Campylobacter* species. J. Bacteriol. **172**:949-955.
- Wassenaar TM & Blaser MJ. 1999. Pathophysiology of *Campylobacter jejuni* infections of humans. Microbes Infect. **1**:1023-1033.
- Wassenaar TM & Newell DG. 2000. Genotyping of *Campylobacter* spp. Appl. Environ. Microbiol. **66**:1-9.
- Wassenaar TM, Fry BN & van der Zeijst BA. 1993. Genetic manipulation of *Campylobacter*: evaluation of natural transformation and electro-transformation. Gene. **132**:131-135.
- Wassenaar TM, van der Zeijst BA, Ayling R & Newell DG. 1993. Colonization of chicks by motility mutants of *Campylobacter jejuni* demonstrates the importance of flagellin A expression. J. Gen. Microbiol. **139**:1171-1175.
- Wassenaar TM. 1997. Toxin production by *Campylobacter* spp. Clin. Microbiol. Rev. **10**:466-476.
- Watson RO & Galán JE. 2005. Signal transduction in *Campylobacter jejuni*-induced cytokine production. Cell. Microbiol. **7**:655-665.
- Whitehouse CA, Balbo PB, Pesci EC, Cottle DL, Mirabito PM & Pickett CL. 1998. *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin causes a G2-phase cell cycle block. Infect. Immun. **66**:1934-1940.
- Woodall Ca, Jones MA, Barrow PA, Hinds J, Marsden GL, Kelly DJ, Dorrell N, Wren BW & Maskell DJ. 2005. *Campylobacter jejuni* Gene Expression in the Chick Cecum: Evidence for Adaptation to a Low-Oxygen Environment. Infect. Immun. **8**(73):5278-5285.

Wooldridge KG, Williams PH & Ketley JM. 1994. Iron-responsive regulation in *Campylobacter jejuni*: cloning and characterization of a fur homolog. J. Bacteriol. **176**:5852-5856.

Yamazaki W, Taguchi M, Ishibashi M, Kitazato M, Nukina M, Misawa N, Inoue K. 2008. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and simple detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. J. Med. Microbiol. **57**(4):444-451.

Yao R, Burr DH & Guerry P. 1997. CheY-mediated modulation of *Campylobacter jejuni* virulence. Molecular Microbiology. **23**:1021-1031.

Young KT, Davis LM & DiRita VJ. 2007. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. Microbiology. Nature Reviews. **5**:665-679.

Yuki N, Taki T, Takahashi M, Saito K, Tai T, Miyatake T & Handa S. 1994. Penner's serotype 4 of *Campylobacter jejuni* has a lipopolysaccharide that bears a GM1 ganglioside epitope as well as one that bears a GD1a epitope. Infect. Immun. **62**:2101-2103.

Zilbauer M, Dorrell N, Boughan PK, Harris A, Wren BW, Klein NJ & Bajaj-Elliott M. 2005. Intestinal Innate Immunity to *Campylobacter jejuni* Results in Induction of Bactericidal Human Beta-Defensins 2 and 3. Infect. Immun. **11**(73):7281-7289.

12. APÉNDICES

APÉNDICE A. - ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

A1. MODELACIÓN MATEMÁTICA DE *Campylobacter* sp.

Modelos matemáticos de las curvas de calibración del inóculo de *Campylobacter* sp.^a

UFC/ml (x10 ⁸)	McFarland	TRANSMITANCIA ₆₀₀ (%)	Modelos Matemáticos	
Y	X	X	LINEAR^b	INVERSO^c
			$\hat{Y} = B_0 + B_1X$	$\hat{Y} = B_0 + B_1/X$
0	0	100	0	0.2
1.5	0.5	74.3	1.5	1.4
3	1	55.6	3	2.8
6	2	35.6	6	6
9	3	26.4	9	9.2
12	4	21.5	12	11.9

^aX = var. independiente; Y = var. dependiente; \hat{Y} = valor estimado de la var. dependiente; B₀ y B₁ = constantes de las fórmulas.
^bModelo Linear: B₁ = 3; X = valor de escala McFarland. R² = 1
^cModelo Inverso: B₀ = -2.956; B₁ = 319.876; X = valor de transmitancia (%). R² = 0.999

Descripción del Modelo Linear

Nombre del modelo	Campy-Mod-Linear
Variable Dependiente	1 UFC/ml (x10 ⁸)
Ecuación	1 Linear
Variable Independiente	McFarland
Constante	Incluida

Resumen de las variables

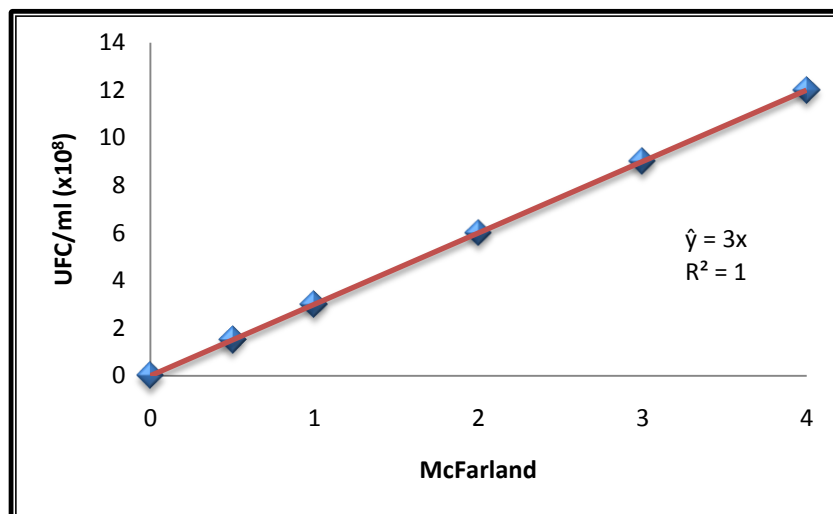
	Variables	
	Dependiente	Independiente
	UFC/ml (x10 ⁸)	McFarland
Número de valores positivos	5	5
Número de ceros	1	1
Número de valores negativos	0	0

Resumen del Modelo y Parámetros Estimados

Variable Dependiente: UFC/ml ($\times 10^8$)

Ecuación	Modelo					Parámetros Estimados	
	R ²	F	gl1	gl2	Sig.	Constante	b1
Linear	1.000	.	1	4	.	.000	3.000

La variable independiente es McFarland.



Descripción del Modelo Inverso

Nombre del Modelo	Campy-Mod-Inverso
Variable Dependiente	1 UFC/ml ($\times 10^8$)
Ecuación	1 Inverso
Variable Independiente	%
Constante	Incluida

Resumen de las variables

	Variables	
	Dependiente	Independiente
	UFC/ml ($\times 10^8$)	%
Número de valores positivos	5	6
Número de ceros	1	0
Número de valores negativos	0	0

Resumen del Modelo

R	R ²	R ² Ajustada	Error Est. del estimado
.999	.999	.998	.197

La variable independiente es %.

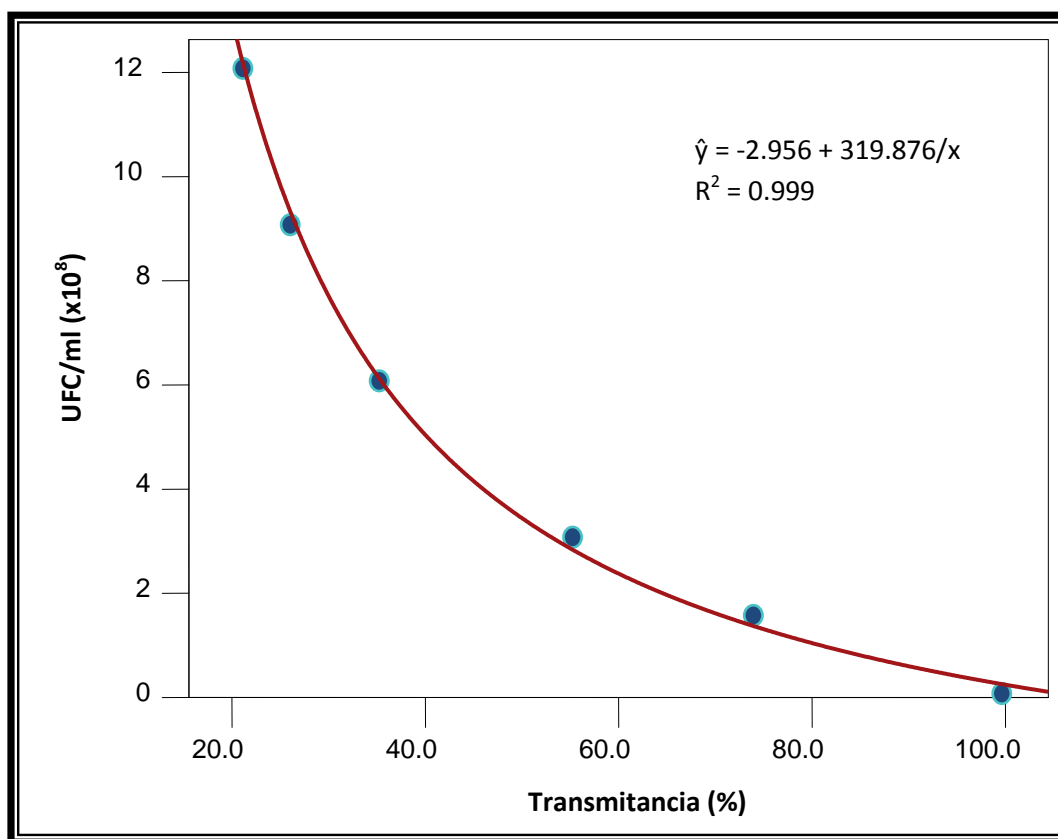
ANOVA

	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrados Medios	F	Sig.
Regresión	106.719	1	106.719	2744.666	.000
Residual	.156	4	.039		
Total	106.875	5			

La variable independiente es %.

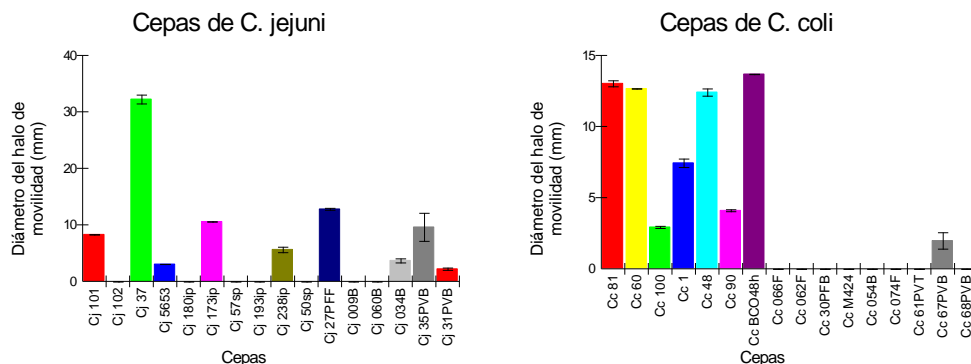
Coefficientes

	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
	B	Error Est.	Beta	B	Std. Error
1 / %	319.876	6.106	.999	52.390	.000
(Constante)	-2.956	.176		-16.786	.000



A2. ENSAYOS DE MOVILIDAD

A2.1. Movilidad de las cepas de *C. jejuni* y de *C. coli*



A2.2. Análisis Estadístico de los ensayos de Movilidad para las cepas de *C. jejuni*

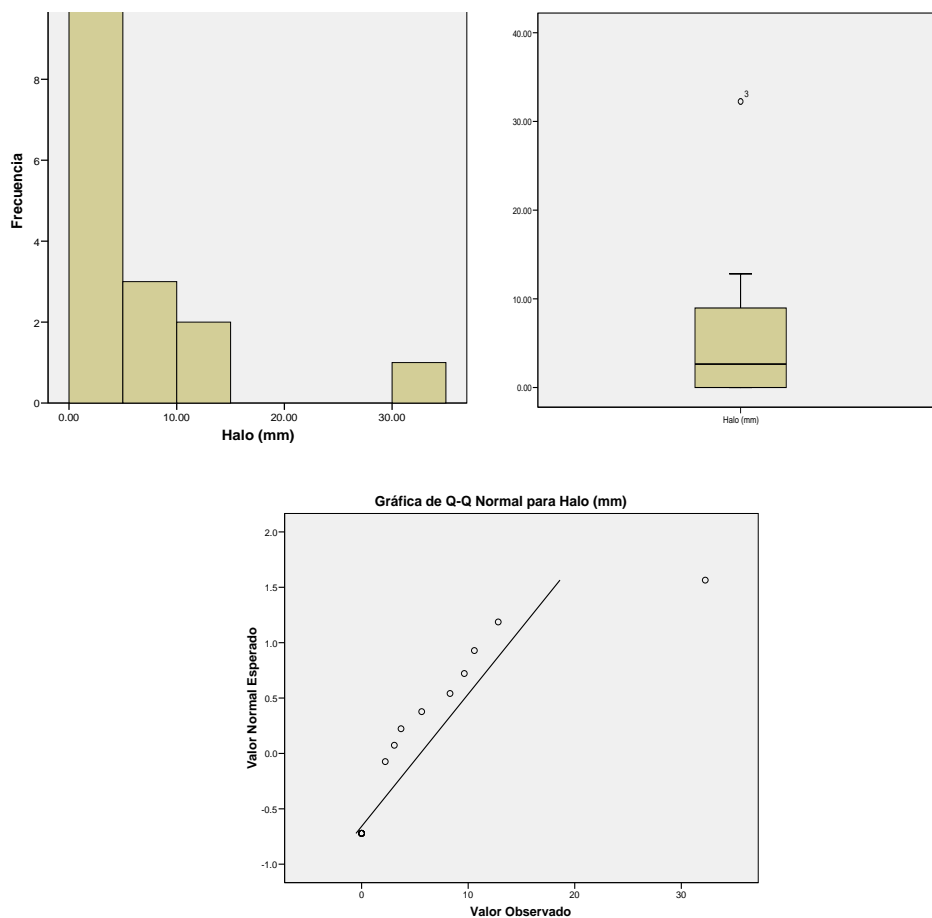
Estadística Descriptiva

			Estadístico	Error Est.
Halo (mm)	Mean		5.5138	2.09324
	95% I.C. para la Media	Límite inferior	1.0521	
		Límite superior	9.9754	
	Mediana		2.6450	
	Varianza		70.107	
	Deav. Estándar		8.37298	
	Mínimo		.00	
	Máximo		32.25	
	Rango		32.25	
	Rango Intercuartil		9.31	
	Sesgo		2.400	.564
	Kurtosis		6.862	1.091

Pruebas de Normalidad

	Kolmogorov-Smirnov ^(a)			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Halo (mm)	.255	16	.007	.697	16	.000

^a Corrección de Significancia de Lilliefors



Prueba de Kruskal-Wallis

Reporte del Análisis de Varianza

CEPAS:

Cj009B, Cj034B, Cj060B, Cj101, Cj102, Cj173ip, Cj180ip, Cj193ip, Cj238ip, Cj27PFF, Cj31PVB, Cj35PVB, Cj37, Cj50sp, Cj5653, Cj57sp

Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on Ranks

Hipótesis

H0: Todas las medianas son iguales.

HA: Por lo menos dos medianas son diferentes.

Resultados de la Prueba

Método	gl	χ^2 (H)	Prob	Decision(0.05)
Not Corrected for Ties	15	42.82653	0.000168	Reject H0
Corrected for Ties	15	46.74384	0.000040	Reject H0
Number Sets of Ties	2			
Multiplicity Factor	9264			

Group Detail

Group	Count	Sum of Ranks	Mean Rank	Z-Value	Median
Cj009B	3	33.00	11.00	-1.7250	0
Cj034B	3	87.00	29.00	0.5750	3.7
Cj060B	3	33.00	11.00	-1.7250	0
Cj101	3	108.00	36.00	1.4694	8.3
Cj102	3	33.00	11.00	-1.7250	0

Guadalupe Ismael Malagón Santiago

Cj173ip	3	120.00	40.00	1.9805	10.58
Cj180ip	3	33.00	11.00	-1.7250	0
Cj193ip	3	33.00	11.00	-1.7250	0
Cj238ip	3	96.00	32.00	0.9583	5.64
Cj27PFF	3	132.00	44.00	2.4916	12.82
Cj31PVB	3	69.00	23.00	-0.1917	2.22
Cj35PVB	3	114.00	38.00	1.7250	9.64
Cj37	3	141.00	47.00	2.8749	32.25
Cj50sp	3	33.00	11.00	-1.7250	0
Cj5653	3	78.00	26.00	0.1917	3.07
Cj57sp	3	33.00	11.00	-1.7250	0

Analysis of Varianza Report

Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test (Dunn's Test)

Variable	Cj009B	Cj034B	Cj060B	Cj101	Cj102
Cj009B	0.0000	1.6451	0.0000	2.2849	0.0000
Cj034B	1.6451	0.0000	1.6451	0.6398	1.6451
Cj060B	0.0000	1.6451	0.0000	2.2849	0.0000
Cj101	2.2849	0.6398	2.2849	0.0000	2.2849
Cj102	0.0000	1.6451	0.0000	2.2849	0.0000
Cj173ip	2.6505	1.0053	2.6505	0.3656	2.6505
Cj180ip	0.0000	1.6451	0.0000	2.2849	0.0000
Cj193ip	0.0000	1.6451	0.0000	2.2849	0.0000
Cj238ip	1.9193	0.2742	1.9193	0.3656	1.9193
Cj27PFF	3.0160	1.3709	3.0160	0.7312	3.0160
Cj31PVB	1.0967	0.5484	1.0967	1.1881	1.0967
Cj35PVB	2.4677	0.8226	2.4677	0.1828	2.4677
Cj37	3.2902	1.6451	3.2902	1.0053	3.2902
Cj50sp	0.0000	1.6451	0.0000	2.2849	0.0000
Cj5653	1.3709	0.2742	1.3709	0.9140	1.3709
Cj57sp	0.0000	1.6451	0.0000	2.2849	0.0000

Regular Test: Medians significantly different if z-value > 1.9600

Bonferroni Test: Medians significantly different if z-value > 3.5293

Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test (Dunn's Test)

Variable	Cj173ip	Cj180ip	Cj193ip	Cj238ip	Cj27PFF
Cj009B	2.6505	0.0000	0.0000	1.9193	3.0160
Cj034B	1.0053	1.6451	1.6451	0.2742	1.3709
Cj060B	2.6505	0.0000	0.0000	1.9193	3.0160
Cj101	0.3656	2.2849	2.2849	0.3656	0.7312
Cj102	2.6505	0.0000	0.0000	1.9193	3.0160
Cj173ip	0.0000	2.6505	2.6505	0.7312	0.3656
Cj180ip	2.6505	0.0000	0.0000	1.9193	3.0160
Cj193ip	2.6505	0.0000	0.0000	1.9193	3.0160
Cj238ip	0.7312	1.9193	1.9193	0.0000	1.0967
Cj27PFF	0.3656	3.0160	3.0160	1.0967	0.0000
Cj31PVB	1.5537	1.0967	1.0967	0.8226	1.9193
Cj35PVB	0.1828	2.4677	2.4677	0.5484	0.5484
Cj37	0.6398	3.2902	3.2902	1.3709	0.2742
Cj50sp	2.6505	0.0000	0.0000	1.9193	3.0160
Cj5653	1.2795	1.3709	1.3709	0.5484	1.6451
Cj57sp	2.6505	0.0000	0.0000	1.9193	3.0160

Regular Test: Medians significantly different if z-value > 1.9600

Bonferroni Test: Medians significantly different if z-value > 3.5293

Analysis of Varianza Report

Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test (Dunn's Test)

Variable	Cj31PVB	Cj35PVB	Cj37	Cj50sp	Cj5653
Cj009B	1.0967	2.4677	3.2902	0.0000	1.3709
Cj034B	0.5484	0.8226	1.6451	1.6451	0.2742
Cj060B	1.0967	2.4677	3.2902	0.0000	1.3709
Cj101	1.1881	0.1828	1.0053	2.2849	0.9140
Cj102	1.0967	2.4677	3.2902	0.0000	1.3709
Cj173ip	1.5537	0.1828	0.6398	2.6505	1.2795
Cj180ip	1.0967	2.4677	3.2902	0.0000	1.3709
Cj193ip	1.0967	2.4677	3.2902	0.0000	1.3709
Cj238ip	0.8226	0.5484	1.3709	1.9193	0.5484
Cj27PFF	1.9193	0.5484	0.2742	3.0160	1.6451
Cj31PVB	0.0000	1.3709	2.1935	1.0967	0.2742
Cj35PVB	1.3709	0.0000	0.8226	2.4677	1.0967
Cj37	2.1935	0.8226	0.0000	3.2902	1.9193
Cj50sp	1.0967	2.4677	3.2902	0.0000	1.3709
Cj5653	0.2742	1.0967	1.9193	1.3709	0.0000
Cj57sp	1.0967	2.4677	3.2902	0.0000	1.3709

Regular Test: Medians significantly different if z-value > 1.9600

Bonferroni Test: Medians significantly different if z-value > 3.5293

Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test (Dunn's Test)

Variable	Cj57sp
Cj009B	0.0000
Cj034B	1.6451
Cj060B	0.0000
Cj101	2.2849
Cj102	0.0000
Cj173ip	2.6505
Cj180ip	0.0000
Cj193ip	0.0000
Cj238ip	1.9193
Cj27PFF	3.0160
Cj31PVB	1.0967
Cj35PVB	2.4677
Cj37	3.2902
Cj50sp	0.0000
Cj5653	1.3709
Cj57sp	0.0000

Regular Test: Medians significantly different if z-value > 1.9600

Bonferroni Test: Medians significantly different if z-value > 3.5293

A2.3. Análisis Estadístico de los ensayos de Movilidad para las cepas de *C. coli*

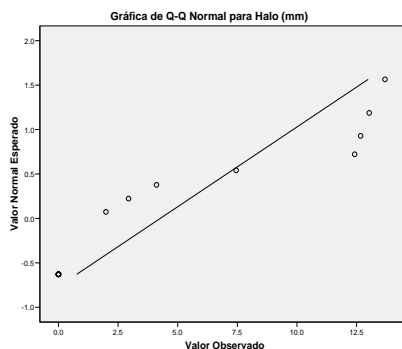
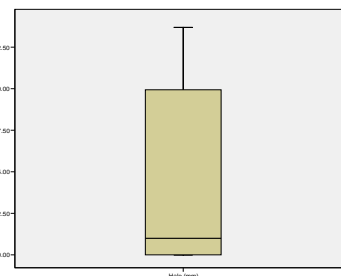
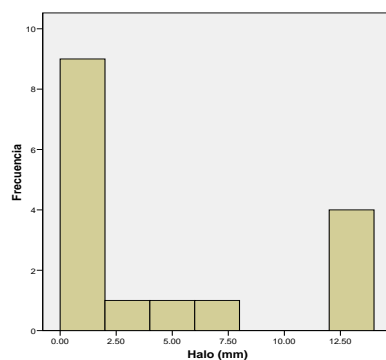
Estadística Descriptiva

			Estadístico	Error Est.
Halo (mm)	Media		4.2688	1.39258
	95% I.C. para la Media	Límite inferior	1.3005	
		Límite superior	7.2370	
	Mediana		.9950	
	Varianza		31.028	
	Desv. Estándar		5.57031	
	Mínimo		.00	
	Máximo		13.69	
	Rango		13.69	
	Rango Intercuartil		11.18	
	Sesgo		.899	.564
	Kurtosis		-1.023	1.091

Pruebas de Normalidad

	Kolmogorov-Smirnov ^(a)			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Halo (mm)	.278	16	.002	.737	16	.000

^a Corrección de Significancia de Lilliefors



Guadalupe Ismael Malagón Santiago

Prueba de Kruskal-Wallis

Reporte del Análisis de Varianza

CEPAS:

Cc054B,Cc062F,Cc066F,Cc074F,Cc1,Cc100,Cc30PFB,Cc48,Cc60,Cc61PVT,Cc67PVB,Cc68PVB,Cc81,Cc90,CcBCO48h,CcM424

Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on Ranks

Hipótesis

H0: Todas las medianas son iguales.

HA: Por lo menos dos medianas son diferentes.

Test Results

Método	gl	χ^2 (H)	Prob Level	Decision(0.05)
Not Corrected for Ties	15	41.05102	0.000314	Reject H0
Corrected for Ties	15	46.90672	0.000038	Reject H0
Number Sets of Ties	1			
Multiplicity Factor	13800			

Group Detail

Group	Count	Sum of Ranks	Mean Rank	Z-Value	Median
Cc054B	3	37.50	12.50	-1.5333	0
Cc062F	3	37.50	12.50	-1.5333	0
Cc066F	3	37.50	12.50	-1.5333	0
Cc074F	3	37.50	12.50	-1.5333	0
Cc1	3	105.00	35.00	1.3416	7.45
Cc100	3	87.00	29.00	0.5750	2.94
Cc30PFB	3	37.50	12.50	-1.5333	0
Cc48	3	114.00	38.00	1.7250	12.42
Cc60	3	123.00	41.00	2.1083	12.67
Cc61PVT	3	37.50	12.50	-1.5333	0
Cc67PVB	3	78.00	26.00	0.1917	1.99
Cc68PVB	3	37.50	12.50	-1.5333	0
Cc81	3	132.00	44.00	2.4916	13.03
Cc90	3	96.00	32.00	0.9583	4.11
CcBCO48h	3	141.00	47.00	2.8749	13.69
CcM424	3	37.50	12.50	-1.5333	0

Analysis of Varianza Report

Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test (Dunn's Test)

Variable	Cc054B	Cc062F	Cc066F	Cc074F	Cc1
Cc054B	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	2.1040
Cc062F	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	2.1040
Cc066F	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	2.1040
Cc074F	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	2.1040
Cc1	2.1040	2.1040	2.1040	2.1040	0.0000
Cc100	1.5430	1.5430	1.5430	1.5430	0.5611
Cc30PFB	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	2.1040
Cc48	2.3846	2.3846	2.3846	2.3846	0.2805
Cc60	2.6651	2.6651	2.6651	2.6651	0.5611
Cc61PVT	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	2.1040
Cc67PVB	1.2624	1.2624	1.2624	1.2624	0.8416
Cc68PVB	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	2.1040
Cc81	2.9457	2.9457	2.9457	2.9457	0.8416
Cc90	1.8235	1.8235	1.8235	1.8235	0.2805
CcBCO48h	3.2262	3.2262	3.2262	3.2262	1.1222
CcM424	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	2.1040

Regular Test: Medians significantly different if z-value > 1.9600

Bonferroni Test: Medians significantly different if z-value > 3.5293

Guadalupe Ismael Malagón Santiago

Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test (Dunn's Test)

Variable	Cc100	Cc30PFB	Cc48	Cc60	Cc61PVT
Cc054B	1.5430	0.0000	2.3846	2.6651	0.0000
Cc062F	1.5430	0.0000	2.3846	2.6651	0.0000
Cc066F	1.5430	0.0000	2.3846	2.6651	0.0000
Cc074F	1.5430	0.0000	2.3846	2.6651	0.0000
Cc1	0.5611	2.1040	0.2805	0.5611	2.1040
Cc100	0.0000	1.5430	0.8416	1.1222	1.5430
Cc30PFB	1.5430	0.0000	2.3846	2.6651	0.0000
Cc48	0.8416	2.3846	0.0000	0.2805	2.3846
Cc60	1.1222	2.6651	0.2805	0.0000	2.6651
Cc61PVT	1.5430	0.0000	2.3846	2.6651	0.0000
Cc67PVB	0.2805	1.2624	1.1222	1.4027	1.2624
Cc68PVB	1.5430	0.0000	2.3846	2.6651	0.0000
Cc81	1.4027	2.9457	0.5611	0.2805	2.9457
Cc90	0.2805	1.8235	0.5611	0.8416	1.8235
CcBCO48h	1.6832	3.2262	0.8416	0.5611	3.2262
CcM424	1.5430	0.0000	2.3846	2.6651	0.0000

Regular Test: Medians significantly different if z-value > 1.9600

Bonferroni Test: Medians significantly different if z-value > 3.5293

Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test (Dunn's Test)

Variable	Cc67PVB	Cc68PVB	Cc81	Cc90	CcBCO48h
Cc054B	1.2624	0.0000	2.9457	1.8235	3.2262
Cc062F	1.2624	0.0000	2.9457	1.8235	3.2262
Cc066F	1.2624	0.0000	2.9457	1.8235	3.2262
Cc074F	1.2624	0.0000	2.9457	1.8235	3.2262
Cc1	0.8416	2.1040	0.8416	0.2805	1.1222
Cc100	0.2805	1.5430	1.4027	0.2805	1.6832
Cc30PFB	1.2624	0.0000	2.9457	1.8235	3.2262
Cc48	1.1222	2.3846	0.5611	0.5611	0.8416
Cc60	1.4027	2.6651	0.2805	0.8416	0.5611
Cc61PVT	1.2624	0.0000	2.9457	1.8235	3.2262
Cc67PVB	0.0000	1.2624	1.6832	0.5611	1.9638
Cc68PVB	1.2624	0.0000	2.9457	1.8235	3.2262
Cc81	1.6832	2.9457	0.0000	1.1222	0.2805
Cc90	0.5611	1.8235	1.1222	0.0000	1.4027
CcBCO48h	1.9638	3.2262	0.2805	1.4027	0.0000
CcM424	1.2624	0.0000	2.9457	1.8235	3.2262

Regular Test: Medians significantly different if z-value > 1.9600

Bonferroni Test: Medians significantly different if z-value > 3.5293

Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test (Dunn's Test)

Variable	CcM424
Cc054B	0.0000
Cc062F	0.0000
Cc066F	0.0000
Cc074F	0.0000
Cc1	2.1040
Cc100	1.5430
Cc30PFB	0.0000
Cc48	2.3846
Cc60	2.6651
Cc61PVT	0.0000
Cc67PVB	1.2624
Cc68PVB	0.0000
Cc81	2.9457
Cc90	1.8235
CcBCO48h	3.2262
CcM424	0.0000

Regular Test: Medians significantly different if z-value > 1.9600

Bonferroni Test: Medians significantly different if z-value > 3.5293

A3. ENSAYOS DE QUIMIOTAXIS

A3.1. Análisis Estadístico de los ensayos de Quimiotaxis para las cepas de *C. jejuni*

Tablas de frecuencias

		Frecuencia	Porcentaje	Valido Porcentaje	Porcentaje Acumulativo
<i>Cj57sp</i>					
Valido	-1	3	33.3	33.3	33.3
	0	6	66.7	66.7	100.0
	Total	9	100.0	100.0	
<i>Cj102</i>					
Valido	-1	4	44.4	44.4	44.4
	0	5	55.6	55.6	100.0
	Total	9	100.0	100.0	
<i>Cj5653</i>					
Valido	-1	4	44.4	44.4	44.4
	0	5	55.6	55.6	100.0
	Total	9	100.0	100.0	
<i>Cj37</i>					
Valido	-1	5	55.6	55.6	55.6
	0	4	44.4	44.4	100.0
	Total	9	100.0	100.0	
<i>Cj193ip</i>					
Valido	-1	4	44.4	44.4	44.4
	0	5	55.6	55.6	100.0
	Total	9	100.0	100.0	
<i>Cj180ip</i>					
Valido	-1	3	33.3	33.3	33.3
	0	6	66.7	66.7	100.0
	Total	9	100.0	100.0	
<i>Cj50sp</i>					
Valido	-1	3	33.3	33.3	33.3
	0	5	55.6	55.6	88.9
	1	1	11.1	11.1	100.0
	Total	9	100.0	100.0	
<i>Cj101</i>					
Valido	-1	4	44.4	44.4	44.4
	0	5	55.6	55.6	100.0
	Total	9	100.0	100.0	

<i>Cj173ip</i>				
Valido	-1	4	44.4	44.4
	0	5	55.6	100.0
	Total	9	100.0	100.0
<i>Cj238ip</i>				
Valido	-1	4	44.4	44.4
	0	4	44.4	88.9
	1	1	11.1	100.0
	Total	9	100.0	100.0
<i>Cj009B</i>				
Valido	-1	4	44.4	44.4
	0	5	55.6	100.0
	Total	9	100.0	100.0
<i>Cj060B</i>				
Valido	-1	3	33.3	33.3
	0	6	66.7	100.0
	Total	9	100.0	100.0
<i>Cj034B</i>				
Valido	-1	3	33.3	33.3
	0	6	66.7	100.0
	Total	9	100.0	100.0
<i>Cj27PFF</i>				
Valido	-1	3	33.3	33.3
	0	6	66.7	100.0
	Total	9	100.0	100.0
<i>Cj35PVB</i>				
Valido	-1	4	44.4	44.4
	0	4	44.4	88.9
	1	1	11.1	100.0
	Total	9	100.0	100.0
<i>Cj31PVB</i>				
Valido	-1	4	44.4	44.4
	0	4	44.4	88.9
	1	1	11.1	100.0
	Total	9	100.0	100.0

Pruebas de Normalidad

Cepas	Kolmogorov-Smirnov ^(a)			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	Gl	Sig.
Cj57sp	.414	9	.000	.617	9	.000
Cj102	.356	9	.002	.655	9	.000
Cj5653	.356	9	.002	.655	9	.000
Cj37	.356	9	.002	.655	9	.000
Cj193ip	.356	9	.002	.655	9	.000
Cj180ip	.414	9	.000	.617	9	.000
Cj50sp	.297	9	.021	.813	9	.028
Cj101	.356	9	.002	.655	9	.000
Cj173ip	.356	9	.002	.655	9	.000
Cj238ip	.272	9	.054	.805	9	.024
Cj009B	.356	9	.002	.655	9	.000
Cj060B	.414	9	.000	.617	9	.000
Cj034B	.414	9	.000	.617	9	.000
Cj27PFF	.414	9	.000	.617	9	.000
Cj35PVB	.272	9	.054	.805	9	.024
Cj31PVB	.272	9	.054	.805	9	.024

^a Corrección de Significancia de Lilliefors

Prueba de Friedman

Cepas	Rango Promedio
Cj57sp	8.89
Cj102	8.00
Cj5653	8.00
Cj37	7.11
Cj193ip	8.00
Cj180ip	8.89
Cj50sp	9.78
Cj101	8.00
Cj173ip	8.00
Cj238ip	8.89
Cj009B	8.00
Cj060B	8.89
Cj034B	8.89
Cj27PFF	8.89
Cj35PVB	8.89
Cj31PVB	8.89

N	9
$\chi^2_{r,0.05}$	15.488
gl	15
Asymp. Sig.	.417

A3.2. Análisis Estadístico de los ensayos de Quimiotaxis para las cepas de *C. coli*

Tablas de Frecuencias

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje Valido	Porcentaje Acumulativo
<i>Cc90</i>					
Valido	-1	5	55.6	55.6	55.6
	0	4	44.4	44.4	100.0
	Total	9	100.0	100.0	
<i>Cc81</i>					
Valido	-1	4	44.4	44.4	44.4
	0	5	55.6	55.6	100.0
	Total	9	100.0	100.0	
<i>Cc1</i>					
Valido	-1	4	44.4	44.4	44.4
	0	4	44.4	44.4	88.9
	1	1	11.1	11.1	100.0
	Total	9	100.0	100.0	
<i>Cc48</i>					
Valido	-1	5	55.6	55.6	55.6
	0	3	33.3	33.3	88.9
	1	1	11.1	11.1	100.0
	Total	9	100.0	100.0	
<i>Cc100</i>					
Valido	-1	3	33.3	33.3	33.3
	0	6	66.7	66.7	100.0
	Total	9	100.0	100.0	
<i>Cc60</i>					
Valido	-1	4	44.4	44.4	44.4
	0	4	44.4	44.4	88.9
	1	1	11.1	11.1	100.0
	Total	9	100.0	100.0	
<i>Cc054B</i>					
Valido	-1	4	44.4	44.4	44.4
	0	5	55.6	55.6	100.0
	Total	9	100.0	100.0	
<i>Cc066F</i>					
Valido	-1	3	33.3	33.3	33.3
	0	6	66.7	66.7	100.0

Total	9	100.0	100.0	
<i>CcM424</i>				
Valido	-1	4	44.4	44.4
	0	4	44.4	88.9
	1	1	11.1	100.0
Total	9	100.0	100.0	
<i>Cc062F</i>				
Valido	-1	4	44.4	44.4
	0	5	55.6	100.0
Total	9	100.0	100.0	
<i>Cc074F</i>				
Valido	-1	4	44.4	44.4
	0	4	44.4	88.9
	1	1	11.1	100.0
Total	9	100.0	100.0	
<i>Cc30PFB</i>				
Valido	-1	3	33.3	33.3
	0	6	66.7	100.0
Total	9	100.0	100.0	
<i>CcBC048h</i>				
Valido	-1	3	33.3	33.3
	0	5	55.6	88.9
	1	1	11.1	100.0
Total	9	100.0	100.0	
<i>Cc61PVT</i>				
Valido	-1	4	44.4	44.4
	0	2	22.2	66.7
	1	3	33.3	100.0
Total	9	100.0	100.0	
<i>Cc67PVB</i>				
Valido	-1	4	44.4	44.4
	0	5	55.6	100.0
Total	9	100.0	100.0	
<i>Cc68PVB</i>				
Valido	-1	4	44.4	44.4
	0	3	33.3	77.8
	1	2	22.2	100.0
Total	9	100.0	100.0	

Pruebas de Normalidad

Cepas	Kolmogorov-Smirnov^(a)			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Cc90	.356	9	.002	.655	9	.000
Cc81	.356	9	.002	.655	9	.000
Cc1	.272	9	.054	.805	9	.024
Cc48	.333	9	.005	.763	9	.008
Cc100	.414	9	.000	.617	9	.000
Cc60	.272	9	.054	.805	9	.024
Cc054B	.356	9	.002	.655	9	.000
Cc066F	.414	9	.000	.617	9	.000
CcM424	.272	9	.054	.805	9	.024
Cc062F	.356	9	.002	.655	9	.000
Cc074F	.272	9	.054	.805	9	.024
Cc30PFB	.414	9	.000	.617	9	.000
CcBCO48h	.297	9	.021	.813	9	.028
Cc61PVT	.275	9	.048	.780	9	.012
Cc67PVB	.356	9	.002	.655	9	.000
Cc68PVB	.269	9	.059	.808	9	.025

^a Corrección de Significancia de Lilliefors

Prueba de Friedman

Cepas	Rango Promedio
Cc90	7.33
Cc81	7.78
Cc1	8.61
Cc48	7.72
Cc100	8.67
Cc60	8.61
Cc054B	7.78
Cc066F	8.67
CcM424	8.61
Cc062F	7.78
Cc074F	8.61
Cc30PFB	8.67
CcBCO48h	9.50
Cc61PVT	10.39
Cc67PVB	7.78
Cc68PVB	9.50

N	9
$\chi^2_{r,0.05}$	17.075
gl	15
Asymp. Sig.	.314

A4. ENSAYOS DE HEMÓLISIS

No es necesario realizar una prueba estadística para evaluar las diferencias en las cepas respecto a su actividad hemolítica, debido a que en todas las cepas se detectó la misma respuesta.

A5. ENSAYOS DE ADHESIÓN E INVASIÓN CELULAR

Campylobacter jejuni

Resumen de casos procesados

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Logaritmo	32	100.0%	0	.0%	32	100.0%

Estadística Descriptiva

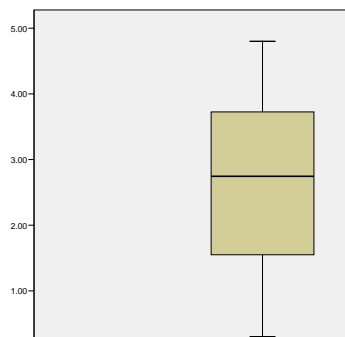
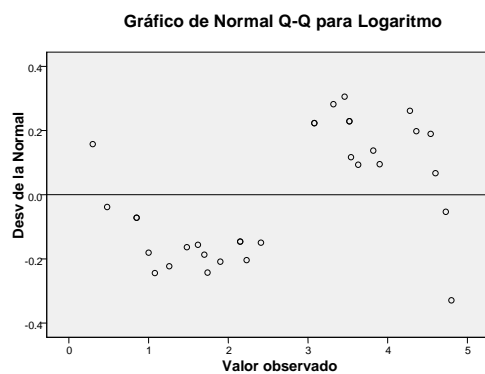
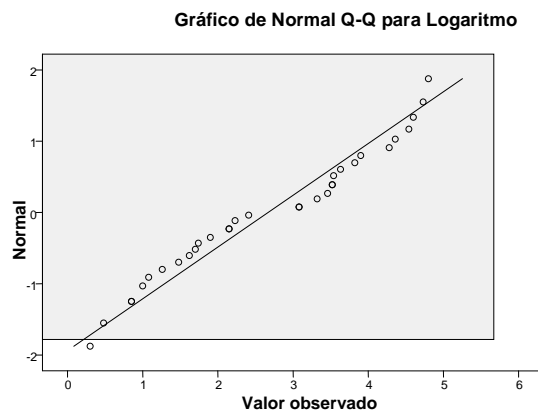
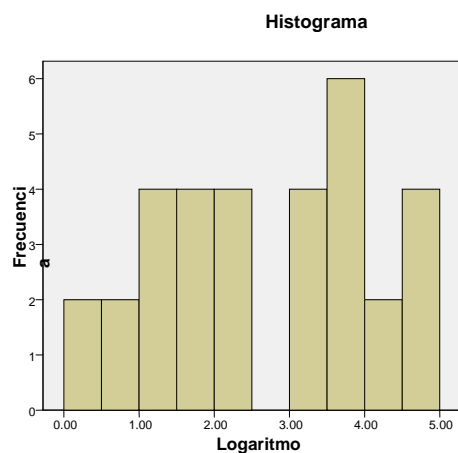
			Estadístico	Error Est.
Logaritmo	Media		2.6681	.24358
	95% IC para la Media	Límite Inf.	2.1713	
		Límite Sup.	3.1649	
	Estadístico		2.7450	
	Varianza		1.899	
	Desv. Estándar		1.37787	
	Mínimo		.30	
	Máximo		4.80	
	Rango		4.50	
	Rango Intercuartil		2.26	
	Sesgo		-.056	.414
	Kurtosis		-1.286	.809

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Logaritmo	.124	32	.200(*)	.943	32	.091

* Este es el límite inferior de la verdadera significancia.

a Corrección de significancia de Lilliefors



Análisis de Varianza Univariada

Estadística Descriptiva

Variable Dependiente: Logaritmo

Cepa	Bloque	Media	Desv. Estándar	N
Cj 009B	Adheridas	3.0800	.	1
	Invasivas	1.4800	.	1
	Total	2.2800	1.13137	2
Cj 034B	Adheridas	3.4600	.	1
	Invasivas	1.7000	.	1
	Total	2.5800	1.24451	2

Guadalupe Ismael Malagón Santiago

Cj 060B	Adheridas	3.9000	.	1
	Invasivas	.3000	.	1
	Total	2.1000	2.54558	2
Cj 101	Adheridas	3.0800	.	1
	Invasivas	.4800	.	1
	Total	1.7800	1.83848	2
Cj 102	Adheridas	4.3600	.	1
	Invasivas	1.7400	.	1
	Total	3.0500	1.85262	2
Cj 173ip	Adheridas	4.2800	.	1
	Invasivas	2.1500	.	1
	Total	3.2150	1.50614	2
Cj 180ip	Adheridas	3.5200	.	1
	Invasivas	1.2600	.	1
	Total	2.3900	1.59806	2
Cj 193ip	Adheridas	3.5400	.	1
	Invasivas	2.2300	.	1
	Total	2.8850	.92631	2
Cj 238ip	Adheridas	3.3200	.	1
	Invasivas	2.1500	.	1
	Total	2.7350	.82731	2
Cj 27PFF	Adheridas	3.5200	.	1
	Invasivas	2.4100	.	1
	Total	2.9650	.78489	2
Cj 31PVB	Adheridas	4.7300	.	1
	Invasivas	1.0800	.	1
	Total	2.9050	2.58094	2
Cj 35PVB	Adheridas	3.8200	.	1
	Invasivas	.8500	.	1
	Total	2.3350	2.10011	2
Cj 37	Adheridas	4.6000	.	1
	Invasivas	1.0000	.	1
	Total	2.8000	2.54558	2
Cj 50sp	Adheridas	4.8000	.	1
	Invasivas	.8500	.	1
	Total	2.8250	2.79307	2
Cj 5653	Adheridas	4.5400	.	1
	Invasivas	1.9000	.	1
	Total	3.2200	1.86676	2
Cj 57sp	Adheridas	3.6300	.	1
	Invasivas	1.6200	.	1
	Total	2.6250	1.42128	2
Total	Adheridas	3.8862	.58446	16
	Invasivas	1.4500	.64538	16
	Total	2.6681	1.37787	32

Prueba de efectos entre-sujetos

Variable Dependiente: Logaritmo

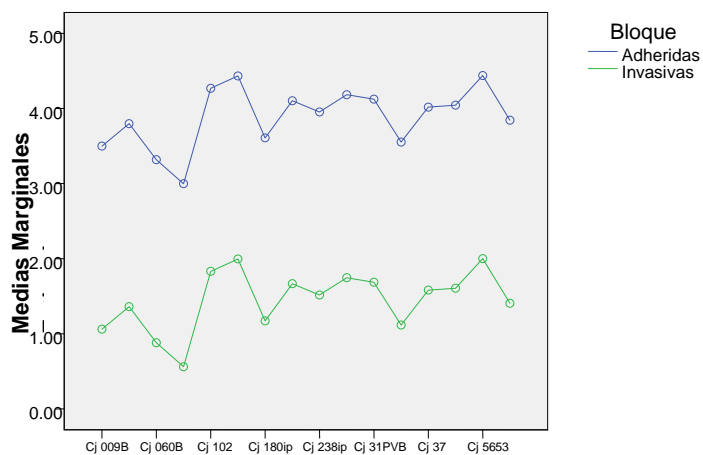
Fuente	Suma de Cuadrados Tipo III	gl	Cuadrados Medios	F	Sig.	Parámetro no cent.	Potencia Observada(a)
Modelo	280.182(b)	17	16.481	38.168	.000	648.860	1.000
Cepa	4.895	15	.326	.756	.703	11.335	.273
Bloque	47.483	1	47.483	109.963	.000	109.963	1.000
Error	6.477	15	.432				
Total	286.659	32					

a Alfa = .05

b R² = .977 (R² Ajustado = .952)

Gráfico de Perfiles

Medias marginales estimadas de Logaritmo



Campylobacter coli

Resumen de casos procesados

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Logaritmo	32	100.0%	0	.0%	32	100.0%

Guadalupe Ismael Malagón Santiago

Estadística Descriptiva

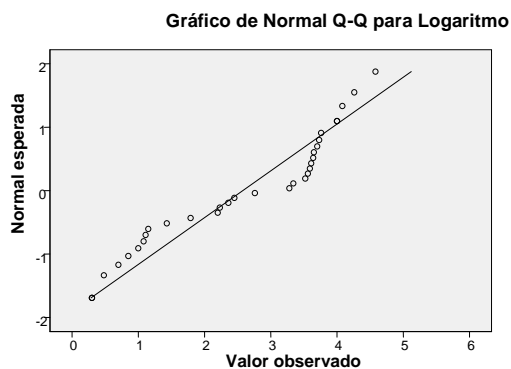
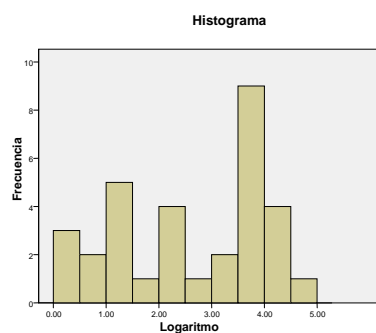
			Estadístico	Error Est.
Logaritmo	Media		2.5778	.23957
	95% IC for Media	Límite Inferior	2.0892	
		Límite Superior	3.0664	
	Mediana		3.0200	
	Varianza		1.837	
	Desv. Estándar		1.35519	
	Mínimo		.30	
	Máximo		4.58	
	Rango		4.28	
	Rango Intercuartil		2.57	
	Sesgo		-.366	.414
	Kurtosis		-1.381	.809

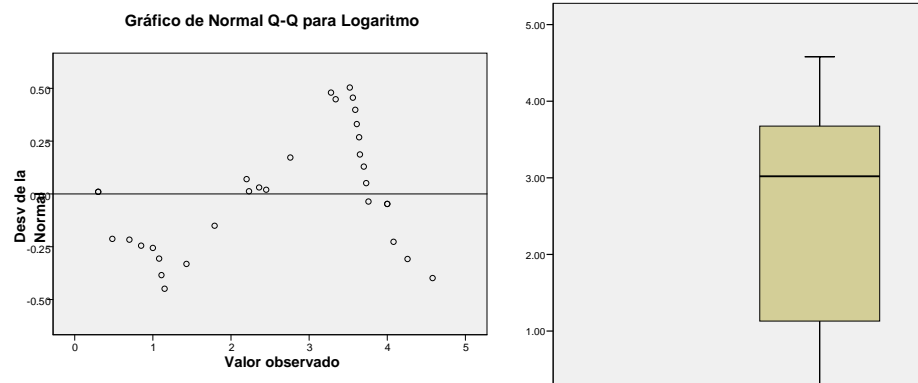
Pruebas de Normalidad

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Logaritmo	.198	32	.003	.898	32	.006

a Corrección de significancia de Lilliefors

Logaritmo





Análisis de Varianza Univariado

Estadística Descriptiva

Variable Dependiente: Logaritmo

Cepa	Bloque	Media	Desv. Estándar	N
Cc 054B	Adheridas	4.5800	.	1
	Invasivas	.4800	.	1
	Total	2.5300	2.89914	2
Cc 062F	Adheridas	3.7600	.	1
	Invasivas	2.4500	.	1
	Total	3.1050	.92631	2
Cc 066F	Adheridas	3.5900	.	1
	Invasivas	1.0000	.	1
	Total	2.2950	1.83141	2
Cc 074F	Adheridas	3.7300	.	1
	Invasivas	1.4300	.	1
	Total	2.5800	1.62635	2
Cc 1	Adheridas	4.0800	.	1
	Invasivas	.8500	.	1
	Total	2.4650	2.28395	2
Cc 100	Adheridas	3.7000	.	1
	Invasivas	2.2300	.	1
	Total	2.9650	1.03945	2
Cc 30PFB	Adheridas	3.5200	.	1
	Invasivas	.3000	.	1
	Total	1.9100	2.27688	2
Cc 48	Adheridas	3.6100	.	1
	Invasivas	1.1100	.	1
	Total	2.3600	1.76777	2
Cc 60	Adheridas	4.0000	.	1
	Invasivas	2.2000	.	1
	Total	3.1000	1.27279	2
Cc 61PVT	Adheridas	4.0000	.	1
	Invasivas	1.0800	.	1

Cc 67PVB	Total	2.5400	2.06475	2
	Adheridas	3.5600	.	1
	Invasivas	.3000	.	1
Cc 68PVB	Total	1.9300	2.30517	2
	Adheridas	3.6500	.	1
	Invasivas	.7000	.	1
Cc 81	Total	2.1750	2.08597	2
	Adheridas	3.2800	.	1
	Invasivas	1.1500	.	1
Cc 90	Total	2.2150	1.50614	2
	Adheridas	3.3400	.	1
	Invasivas	1.7900	.	1
Cc BCO48h	Total	2.5650	1.09602	2
	Adheridas	3.6400	.	1
	Invasivas	2.3600	.	1
Cc M424	Total	3.0000	.90510	2
	Adheridas	4.2600	.	1
	Invasivas	2.7600	.	1
Total	Total	3.5100	1.06066	2
	Adheridas	3.7688	.33917	16
	Invasivas	1.3869	.80915	16
Total		2.5778	1.35519	32

Pruebas de efectos entre-sujetos

Variable Dependiente: Logaritmo

Fuente	Suma de Cuadrados Tipo III	gl	Cuadrados Medios	F	Sig.
Modelo	264.133(a)	17	15.537	42.812	.000
Cepa	6.103	15	.407	1.121	.414
Bloque	45.387	1	45.387	125.061	.000
Error	5.444	15	.363		
Total	269.577	32			

a $R^2 = .980$ (R^2 Ajustado = .957)

Medias Marginales Estimadas

1. Cepa

Variable Dependiente: Logaritmo

Cepa	Media	Error Est.	95% IC	
	Límite Inferior	Límite Superior	Límite Inferior	Límite Superior
Cc 054B	2.530	.426	1.622	3.438
Cc 062F	3.105	.426	2.197	4.013
Cc 066F	2.295	.426	1.387	3.203
Cc 074F	2.580	.426	1.672	3.488

Guadalupe Ismael Malagón Santiago

Cc 1	2.465	.426	1.557	3.373
Cc 100	2.965	.426	2.057	3.873
Cc 30PFB	1.910	.426	1.002	2.818
Cc 48	2.360	.426	1.452	3.268
Cc 60	3.100	.426	2.192	4.008
Cc 61PVT	2.540	.426	1.632	3.448
Cc 67PVB	1.930	.426	1.022	2.838
Cc 68PVB	2.175	.426	1.267	3.083
Cc 81	2.215	.426	1.307	3.123
Cc 90	2.565	.426	1.657	3.473
Cc BCO48h	3.000	.426	2.092	3.908
Cc M424	3.510	.426	2.602	4.418

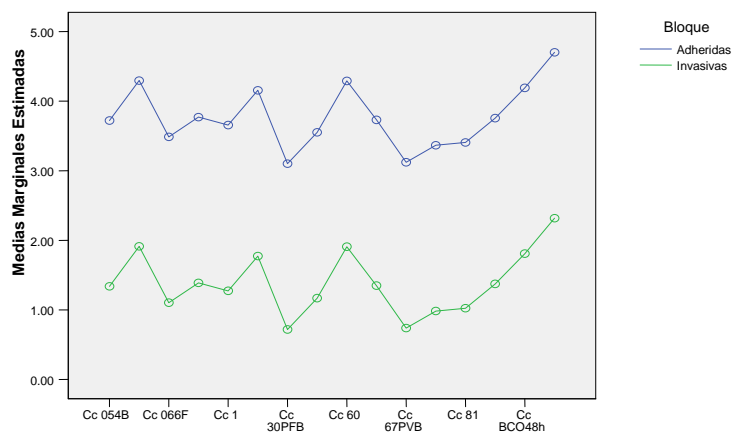
2. Bloque

Variable Dependiente: Logaritmo

Bloque	Media	Error Est.	95% IC	
	Límite Inferior	Límite Superior	Límite Inferior	Límite Superior
Adheridas	3.769	.151	3.448	4.090
Invasivas	1.387	.151	1.066	1.708

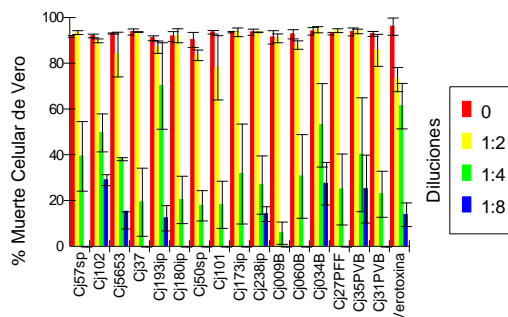
Gráfico de perfiles

Medias Marginales Estimadas de Logaritmo

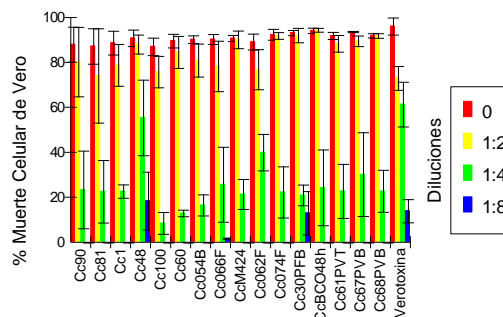


A6. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

Citotoxicidad de las cepas de *C. jejuni*



Citotoxicidad de las cepas de *C. coli*



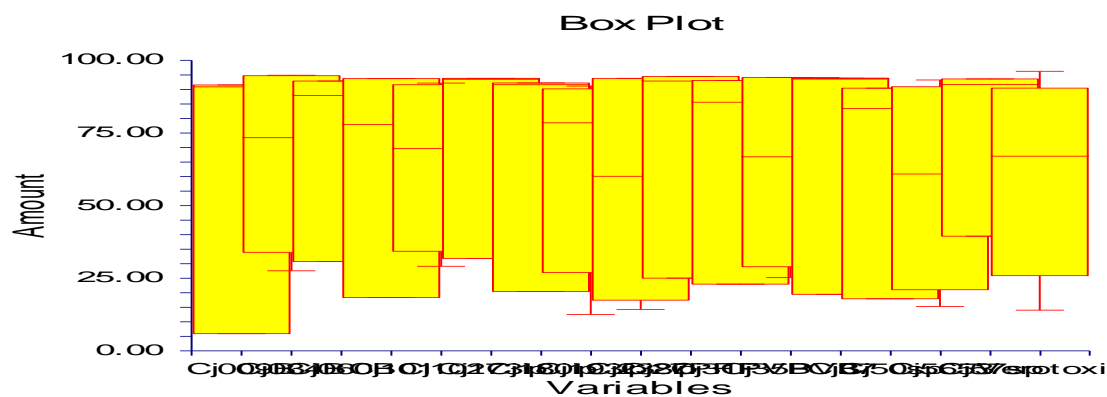
Campylobacter jejuni

Analysis of Varianza Report

Response:

Cj009B, Cj034B, Cj060B, Cj101, Cj102, Cj173ip, Cj180ip, Cj193ip, Cj238ip, Cj27PFF, Cj31PVB, Cj35PVB, Cj37, Cj50sp, Cj5653, Cj57sp, Verotoxina

Box Plot Section



Analysis of Varianza Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A (...)	16	1345.098	84.06863	0.06	1.000000	0.066800
S(A)	41	58448.65	1425.577			
Total (Adjusted)	57	59793.75				
Total	58					

* Term significant at alpha = 0.05

Guadalupe Ismael Malagón Santiago

Analysis of Varianza Report

Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on Ranks

Hypotheses

H0: All medians are equal.

Ha: At least two medians are different.

Test Results

Method	DF	Chi-Square (H)	Prob Level	Decision(0.05)
Not Corrected for Ties	16	5.70339	0.990995	Accept H0
Corrected for Ties	16	5.70339	0.990995	Accept H0
Number Sets of Ties	0			
Multiplicity Factor	0			

Group Detail

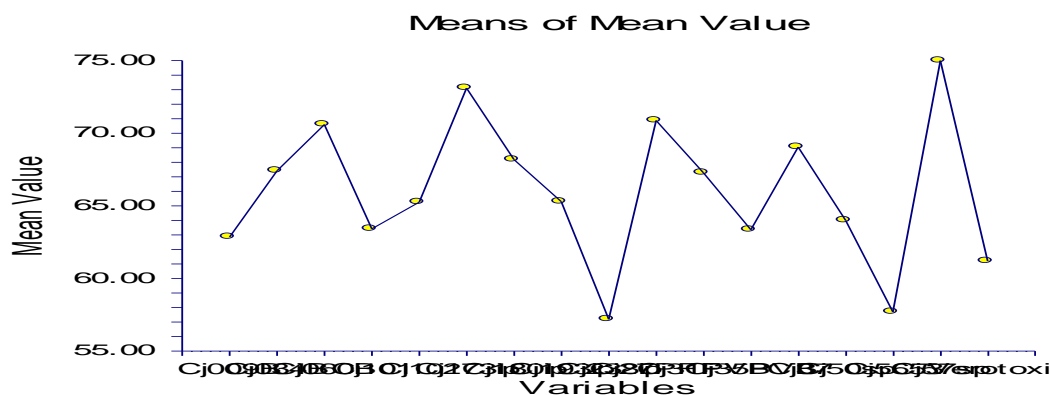
Group	Count	Sum of Ranks	Mean Rank	Z-Value	Median
Cj009B	3	71.00	23.67	-0.6144	91.124
Cj034B	4	148.00	37.00	0.9206	73.6225
Cj060B	3	88.00	29.33	-0.0176	88.159
Cj101	3	79.00	26.33	-0.3335	78.209
Cj102	4	107.00	26.75	-0.3375	69.879
Cj173ip	3	114.00	38.00	0.8953	93.723
Cj180ip	3	86.00	28.67	-0.0878	91.886
Cj193ip	4	91.00	22.75	-0.8285	78.759
Cj238ip	4	114.00	28.50	-0.1227	60.349
Cj27PFF	3	110.00	36.67	0.7549	93.152
Cj31PVB	3	81.00	27.00	-0.2633	85.845
Cj35PVB	4	139.00	34.75	0.6444	67.0455
Cj37	3	111.00	37.00	0.7900	93.832
Cj50sp	3	66.00	22.00	-0.7900	83.677
Cj5653	4	95.00	23.75	-0.7058	61.1405
Cj57sp	3	102.00	34.00	0.4740	91.911
Verotoxina	4	109.00	27.25	-0.2762	67.273

Analysis of Varianza Report

Means and Effects Section

Term	Count	Mean	Standard Error	Effect
All	58	65.55876		65.98109
A:				
Cj009B	3	62.852	21.7989	-3.129083
Cj034B	4	67.413	18.8784	1.431917
Cj060B	3	70.58933	21.7989	4.60825
Cj101	3	63.41133	21.7989	-2.56975
Cj102	4	65.251	18.8784	-0.7300833
Cj173ip	3	73.10267	21.7989	7.121583
Cj180ip	3	68.18233	21.7989	2.20125
Cj193ip	4	65.2875	18.8784	-0.6935833
Cj238ip	4	57.18625	18.8784	-8.794833
Cj27PFF	3	70.86567	21.7989	4.884583
Cj31PVB	3	67.27167	21.7989	1.290583
Cj35PVB	4	63.35025	18.8784	-2.630833
Cj37	3	69.04266	21.7989	3.061583
Cj50sp	3	63.99733	21.7989	-1.98375
Cj5653	4	57.6935	18.8784	-8.287583
Cj57sp	3	74.99067	21.7989	9.009583
Verotoxina	4	61.19125	18.8784	-4.789834

Plots of Means Section



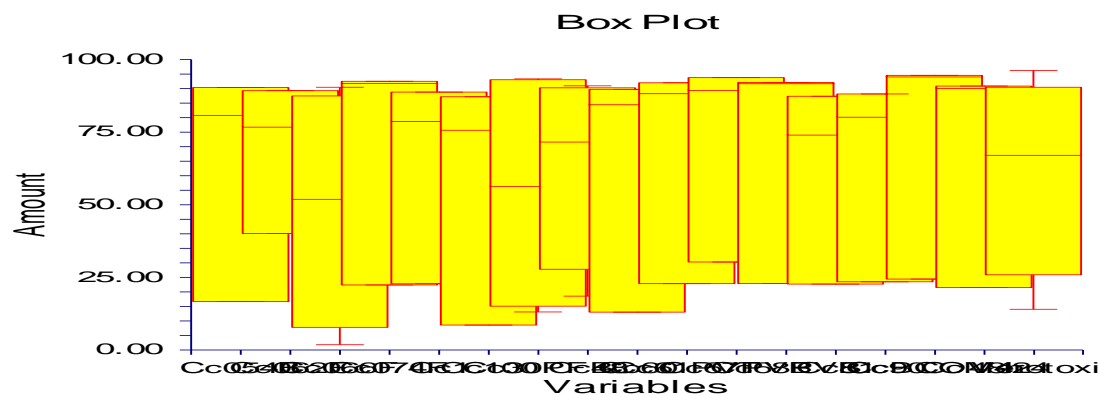
Campylobacter coli

Analysis of Varianza Report

Response:

Cc054B,Cc062F,Cc066F,Cc074F,Cc1,Cc100,Cc30PFB,Cc48,Cc60,Cc61PVT,Cc67PVB,Cc68PVB,Cc81,Cc90,CcBCO48h,CcM424,Verotoxina

Box Plot Section



Analysis of Varianza Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A (...)	16	1994.41	124.6506	0.08	0.999998	0.074494
S(A)	38	55769.99	1467.631			
Total (Adjusted)	54	57764.4				
Total	55					

* Term significant at alpha = 0.05

Analysis of Varianza Report

Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on Ranks

Hypotheses

H0: All medians are equal.

Ha: At least two medians are different.

Test Results

Method	DF	Chi-Square (H)	Prob Level	Decision(0.05)
Not Corrected for Ties	16	6.933117	0.974529	Accept H0
Corrected for Ties	16	6.933117	0.974529	Accept H0
Number Sets of Ties	0			
Multiplicity Factor	0			

Guadalupe Ismael Malagón Santiago

Group Detail

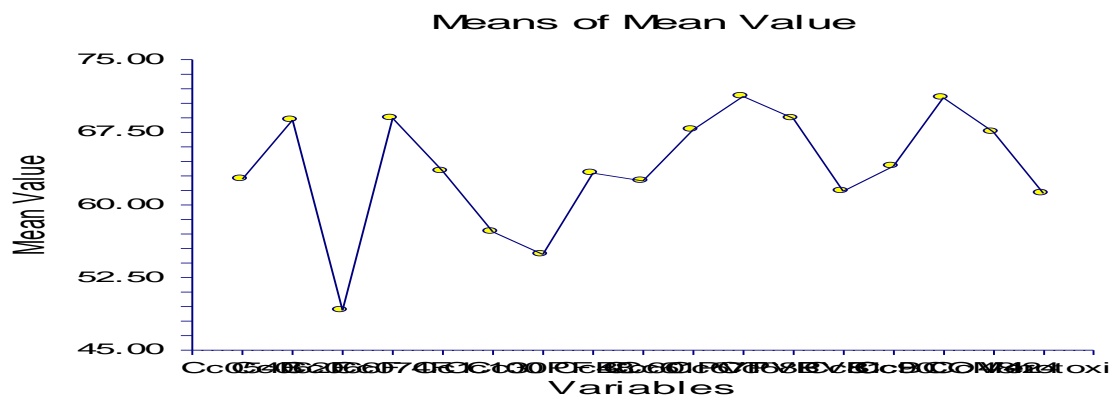
Group	Count	Sum of Ranks	Mean Rank	Z-Value	Median
Cc054B	3	76.00	25.33	-0.2965	81.036
Cc062F	3	81.00	27.00	-0.1112	76.964
Cc066F	4	86.00	21.50	-0.8427	52.127
Cc074F	3	107.00	35.67	0.8524	91.992
Cc1	3	75.00	25.00	-0.3336	78.906
Cc100	3	57.00	19.00	-1.0007	75.916
Cc30PFB	4	112.00	28.00	0.0000	56.5755
Cc48	4	105.00	26.25	-0.2269	71.841
Cc60	3	72.00	24.00	-0.4447	84.688
Cc61PVT	3	94.00	31.33	0.3706	88.479
Cc67PVB	3	108.00	36.00	0.8895	89.597
Cc68PVB	3	107.00	35.67	0.8524	91.927
Cc81	3	66.00	22.00	-0.6671	74.233
Cc90	3	76.00	25.33	-0.2965	80.377
CcBCO48h	3	123.00	41.00	1.4454	94.254
CcM424	3	92.00	30.67	0.2965	90.272
Verotoxina	4	103.00	25.75	-0.2917	67.273

Analysis of Varianza Report

Means and Effects Section

Term	Count	Mean	Standard Error	Effect
All	55	63.27536		63.75831
A:				
Cc054B	3	62.65867	22.1181	-1.099642
Cc062F	3	68.76234	22.1181	5.004025
Cc066F	4	49.116	19.15484	-14.64231
Cc074F	3	68.95067	22.1181	5.192358
Cc1	3	63.47867	22.1181	-0.2796422
Cc100	3	57.21867	22.1181	-6.539642
Cc30PFB	4	54.88425	19.15484	-8.874059
Cc48	4	63.27975	19.15484	-0.4785588
Cc60	3	62.46767	22.1181	-1.290642
Cc61PVT	3	67.75733	22.1181	3.999024
Cc67PVB	3	71.20167	22.1181	7.443358
Cc68PVB	3	68.942	22.1181	5.183691
Cc81	3	61.40533	22.1181	-2.352976
Cc90	3	63.987	22.1181	0.2286912
CcBCO48h	3	71.06133	22.1181	7.303024
CcM424	3	67.52866	22.1181	3.770358
Verotoxina	4	61.19125	19.15484	-2.567059

Plots of Means Section



Guadalupe Ismael Malagón Santiago

A7. ANÁLISIS MULTIVARIANTES

ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

Para evaluar la virulencia de las cepas de *Campylobacter* sp. (*C. coli* y *C. jejuni*)

Matriz de Correlación

		Movilidad	Quimiotaxis	Actividad Hemolítica tipo Alfa	Actividad Hemolítica tipo Beta	Adhesión Celular en Vero	Invasión Celular en Vero	CDT
Correlación	Movilidad	1.000	-.031	.122	.122	.145	.115	.293
	Quimiotaxis	-.031	1.000	.902	.902	.755	.284	.664
	Actividad Hemolítica tipo Alfa	.122	.902	1.000	1.000	.819	.329	.663
	Actividad Hemolítica tipo Beta	.122	.902	1.000	1.000	.819	.329	.663
	Adhesión Celular en Vero	.145	.755	.819	.819	1.000	.249	.533
	Invasión Celular en Vero	.115	.284	.329	.329	.249	1.000	.252
	CDT	.293	.664	.663	.663	.533	.252	1.000

Communalities

	Inicial	Extracción
Movilidad	1.000	.909
Quimiotaxis	1.000	.910
Actividad Hemolítica tipo Alfa	1.000	.951
Actividad Hemolítica tipo Beta	1.000	.951
Adhesión Celular en Vero	1.000	.750
Invasión Celular en Vero	1.000	.233
CDT	1.000	.649

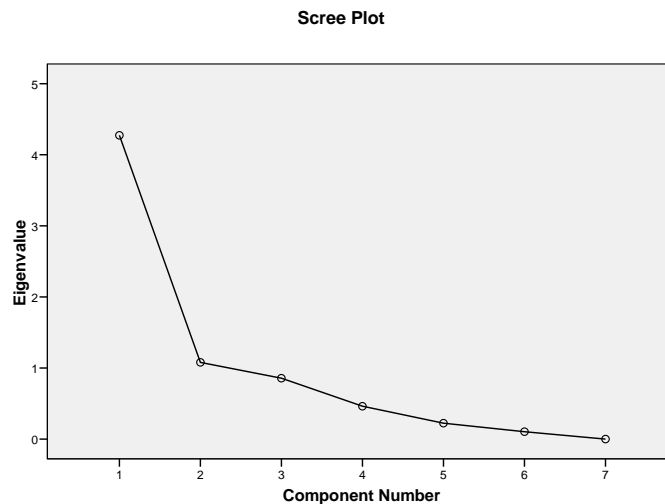
Método de Extracción: Análisis de Componentes Principales.

Total de Varianza Explicada

Componente	Autovalores Iniciales			Extracción de Suma de Cuadrados			Rotación de Suma de Cuadrados		
	Total	% de Varianza	% Acumulativo	Total	% de Varianza	% Acumulativo	Total	% de Varianza	% Acumulativo
1	4.274	61.052	61.052	4.274	61.052	61.052	4.100	58.569	58.569
2	1.079	15.420	76.472	1.079	15.420	76.472	1.253	17.903	76.472
3	.857	12.237	88.709						
4	.462	6.605	95.313						
5	.224	3.198	98.512						
6	.104	1.488	100.000						
7	1.53E-016	2.18E-015	100.000						

Método de Extracción: Análisis de Componentes Principales.

Guadalupe Ismael Malagón Santiago



Matriz de Componentes(a)

	Componente	
	1	2
Movilidad	.185	.935
Quimiotaxis	.924	-.238
Actividad Hemolítica tipo Alfa	.971	-.094
Actividad Hemolítica tipo Beta	.971	-.094
Adhesión Celular en Vero	.863	-.071
Invasión Celular en Vero	.406	.260
CDT	.769	.240

Método de Extracción: Análisis de Componentes Principales.
a 2 Componentes Extraídos.

Matriz de Componentes Rotados(a)

	Componente	
	1	2
Movilidad	-.038	.953
Quimiotaxis	.954	-.016
Actividad Hemolítica tipo Alfa	.966	.135
Actividad Hemolítica tipo Beta	.966	.135
Adhesión Celular en Vero	.856	.133
Invasión Celular en Vero	.334	.348
CDT	.692	.413

Método de Extracción: Análisis de Componentes Principales.
Método de Rotación: Varimax con Normalización de Kaiser
a Rotación convergente en 3 iteraciones.

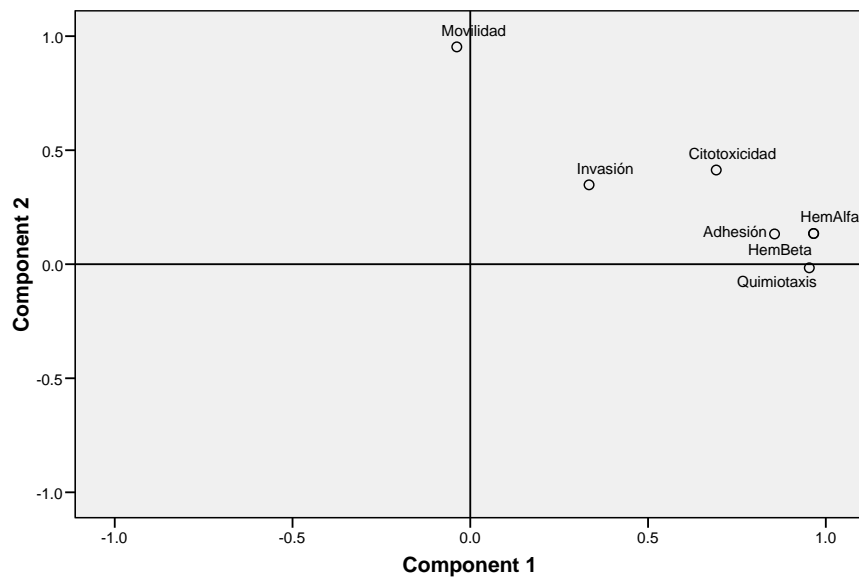
Matriz de Transformación de los componentes

Componente	1	2
1	.972	.233
2	-.233	.972

Método de Extracción: Análisis de Componentes Principales.

Método de Rotación: Varimax con Normalización de Kaiser

Component Plot in Rotated Space



Matriz de Coeficiente de los valores de los Componentes

	Componente	
	1	2
Movilidad	-.160	.853
Quimiotaxis	.262	-.164
Actividad Hemolítica tipo Alfa	.241	-.032
Actividad Hemolítica tipo Beta	.241	-.032
Adhesión Celular en Vero	.212	-.016
Invasión Celular en Vero	.036	.257
CDT	.123	.258

ESCALAMIENTO MULTIDIMENSIONAL (ALSCAL)

C:\Users\Toshiba\ISMAEL\Postgrado-UANL\Proyecto\Tesis Maestria\Resultados\Multivariante\Componentes Principales.sav

Iteration history for the 2 dimensional solution (in squared distances)

Young's S-stress formula 1 is used.

Iteration	S-stress	Improvement
1	.04218	
2	.03551	.00667
3	.03229	.00323
4	.03026	.00203
5	.02880	.00145
6	.02764	.00117
7	.02663	.00100
8	.02574	.00089

Iterations stopped because
S-stress improvement is less than .001000

Stress and squared correlation (RSQ) in distances

RSQ values are the proportion of variance of the scaled data (disparities)
in the partition (row, matrix, or entire data) which
is accounted for by their corresponding distances.
Stress values are Kruskal's stress formula 1.

For matrix

Stress = .06118 RSQ = .99017

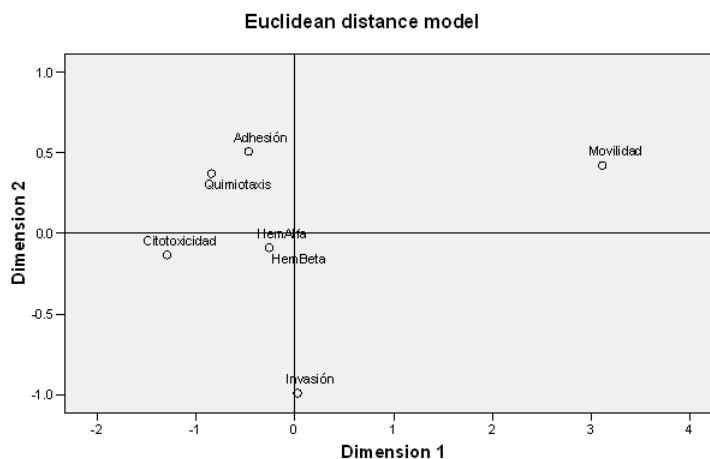
□

Configuration derived in 2 dimensions

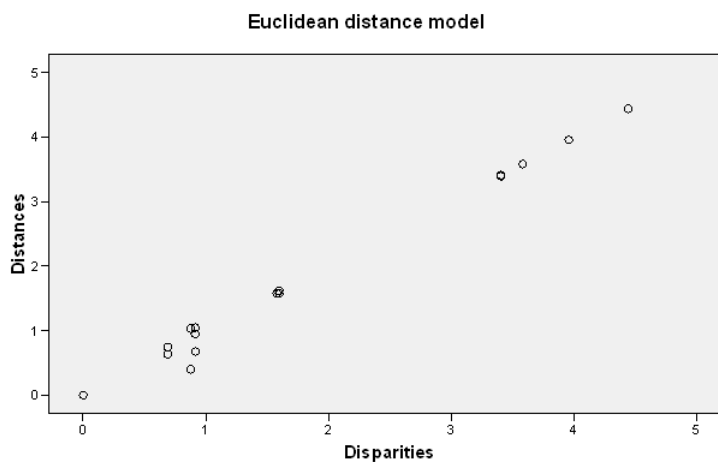
Stimulus Coordinates		Dimension	
Stimulus Number	Stimulus Name	1	2
1	Movilidad	3.1084	.4209
2	Quimiotaxis	-.8458	.3713
3	HemAlfa	-.2616	-.0883
4	HemBeta	-.2616	-.0883
5	Adhesión	-.4705	.5075
6	Invasión	.0259	-.9905
7	Citotoxicidad	-1.2949	-.1326

□

Derived Stimulus Configuration



Scatterplot of Linear Fit



CORRELACIÓN MULTIVARIANTE

Campylobacter jejuni

PROXIMITIES

Aislamiento Movilidad Quimiotaxis HemAlfa HemBeta Adhesión Invasión
 Citotoxicidad
 /VIEW=VARIABLE
 /MEASURE= CORRELATION
 /STANDARDIZE= NONE .

Proximities

[DataSet2] C:\Users\Toshiba\ISMAEL\Postgrado-UANL\Proyecto\Tesis Maestria\Resultados\Multivariante\Campylobacter
 jejuni.sav

Guadalupe Ismael Malagón Santiago

Case Processing Summary

Cases					
Valid		Missing		Total	
N	Percent	N	Percent	N	Percent
16	100.0%	0	.0%	16	100.0%

Proximity Matrix

	Correlation between Vectors of Values (Coef. Correlación de Pearson)							
	Fuente de Aislamiento	Halo de Movilidad (mm)	Comportamiento Quimiotáctico	Actividad Hemolítica tipo Alfa	Actividad Hemolítica tipo Beta	Adhesión Celular en Vero (Logaritmo UFC)	Invasión Celular en Vero (Logaritmo UFC)	CDT produce muerte celular de Vero
Fuente de Aislamiento	1.000	.191	-.333	.000	.000	.167	-.190	-.027
Halo de Movilidad (mm)	.191	1.000	-.524	.000	.000	.194	-.039	.598
Comportamiento Quimiotáctico	-.333	-.524	1.000	.000	.000	-.012	-.139	-.080
Actividad Hemolítica tipo Alfa	.000	.000	.000	1.000	.000	.000	.000	.000
Actividad Hemolítica tipo Beta	.000	.000	.000	.000	1.000	.000	.000	.000
Adhesión Celular en Vero (Logaritmo UFC)	.167	.194	-.012	.000	.000	1.000	-.140	-.044
Invasión Celular en Vero (Logaritmo UFC)	-.190	-.039	-.139	.000	.000	-.140	1.000	.152
CDT produce muerte celular de Vero	-.027	.598	-.080	.000	.000	-.044	.152	1.000

This is a similarity matrix

Campylobacter coli

PROXIMITIES

Aislamiento Movilidad Quimiotaxis HemAlfa HemBeta Adhesión Invasión
Citotoxicidad
/VIEW=VARIABLE
/MEASURE= CORRELATION
/STANDARDIZE= NONE .

Proximities

[DataSet1] C:\Users\Toshiba\ISMAEL\Postgrado-UANL\Proyecto\Tesis Maestria\Resultados\Multivariante\Campylobacter coli.sav

Case Processing Summary

Cases					
Valid		Missing		Total	
N	Percent	N	Percent	N	Percent
16	100.0%	0	.0%	16	100.0%

Guadalupe Ismael Malagón Santiago

Proximity Matrix

	Correlation between Vectors of Values (Coef. Correlación de Pearson)							
	Fuente de Aislamiento	Halo de Movilidad (mm)	Comportamiento Quimiotáctico	Actividad Hemolítica tipo Alfa	Actividad Hemolítica tipo Beta	Adhesión Celular en Vero (Logaritmo UFC)	Invasión Celular en Vero (Logaritmo UFC)	CDT produce muerte celular de Vero
Fuente de Aislamiento	1.000	-.003	.050	.000	.000	.439	.539	.006
Halo de Movilidad (mm)	-.003	1.000	-.133	.000	.000	-.255	.223	-.098
Comportamiento Quimiotáctico	.050	-.133	1.000	.000	.000	.186	.038	.404
Actividad Hemolítica tipo Alfa	.000	.000	.000	1.000	.000	.000	.000	.000
Actividad Hemolítica tipo Beta	.000	.000	.000	.000	1.000	.000	.000	.000
Adhesión Celular en Vero (Logaritmo UFC)	.439	-.255	.186	.000	.000	1.000	.080	.005
Invasión Celular en Vero (Logaritmo UFC)	.539	.223	.038	.000	.000	.080	1.000	-.025
CDT produce muerte celular de Vero	.006	-.098	.404	.000	.000	.005	-.025	1.000

This is a similarity matrix

APÉNDICE B. - MEDIOS DE CULTIVO, SOLUCIONES Y REACTIVOS

B1. MEDIOS DE CULTIVO

**** CALDO SOYA TRIPTICASA (CST)**

17 g Digerido pancreático de caseína
 3 g Digerido enzimático de soya
 2.5 g Dextrosa
 5 g Cloruro de sodio
 2.5 g Fosfato dipotásico
 1 L Agua destilada
 pH 7.3 ± 0.2

**** AGAR SOYA TRIPTICASA (AST)**

cbp 1 L Caldo soya tripticasa
 15 g Agar

**** CALDO INFUSIÓN CEREBRO CORAZÓN (ICC)**

6 g Infusión de cerebro corazón
 6 g Peptona de carne
 5 g Cloruro de sodio
 3 g Dextrosa
 14.5 g Peptona de gelatina
 2.5 g Fosfato disódico
 1 L Agua destilada
 pH 7.4 ± 0.2
 Nota: adicionar 0.6% de extracto de levadura.

**** AGAR MUELLER HINTON (AMH)**

2 g Extracto de carne
 17.5 g Peptona de caseína ácida
 1.5 g Almidón
 17 g Agar
 1 L Agua destilada
 pH 7.4 ± 0.2
 Nota: agregar 5 % de sangre de humano, lisada o sin lisar, según se requiera.

**** AGAR BRUCELLA (AB)**

10 g Caseína digerida por enzimas pancreáticas
 10 g Tejido animal digerido por enzimas pépticas
 1 g Dextrosa
 2 g Extracto de levadura
 5 g Cloruro de sodio
 0.1 g Bisulfito sódico
 15 g Agar
 1 L Agua destilada
 pH 7.0 ± 0.2
 Nota: agregar 5 % de sangre de humano, lisada o sin lisar, según se requiera.

**** AGAR NUTRITIVO CON SANGRE (ANS)**

5 g Peptona de gelatina
3 g Extracto de carne
50 ml Sangre de humano
15 g Agar

pH 6.5 ± 0.2 ó 7.5 ± 0.2

Nota: ajustar el pH a 6.5 para detectar α -hemólisis; ajustar el pH a 7.5 para detectar β -hemólisis.

**** Medio DMEM con 1% L-glutamina + 3% SFB**

2 ml L-glutamina
6 ml Suero Fetal Bovino (SFB)
c.b.p. 200 ml Medio DMEM

Nota: Formulación del medio de cultivo para células Vero.

B2. SOLUCIONES Y REACTIVOS

▲ CLORURO TRIFENIL TETRAZOLIO (TTC) AL 1%

1 g Cloruro trifenil tetrazolio
99 ml Agua destilada estéril

Notas: a) esterilizar por filtración

b) mantener protegido de la luz

c) agregar 5 ml de TTC 1% por cada 1 L de medio de cultivo

▲ BUFFER SALINO DE FOSFATOS (PBS), 10x

80 g NaCl
2.2 g KCl
9.9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
2 g K_2HPO_4

cbp 1 L Agua destilada

pH 6.6 ± 0.2 ó 7.0 ± 0.2

Notas: a) almacenar indefinidamente a temperatura ambiente

b) antes de utilizar, diluir a 1x mezclando PBS 10x con H_2O (1:9)

c) una vez preparado el PBS 1x, el pH es de 7.0 ± 0.2 si el PBS 10x se ajusta a pH 6.6 ± 0.2

d) una vez preparado el PBS 1x, el pH es de 7.4 ± 0.2 si el PBS 10x se ajusta a pH 7.0 ± 0.2

▲ **AGENTES QUIMIOTÁCTICOS (AQ's) a [0.1M] y pH 7.0**

Para preparar 50 ml de cada AQ:

AQ's	Cantidad (g)	Peso molecular del AQ	Diluyente PBS (ml) cbp	Molaridad (M)	pH	Efecto quimiotáctico reportado*
L- ácido aspártico	0.6655	133.1	50	0.1	7.0	Atrayente
L-cisteína hidrocloreada	0.7881	157.62	50	0.1	7.0	Atrayente
L-serina	0.5255	105.1	50	0.1	7.0	Atrayente
Citrato (sodio)	1.4705	194.1	50	0.1	7.0	Atrayente
Ácido cólico	2.153	430.6	50	0.1	7.0	Repelente
Ácido deoxicólico	2.073	414.6	50	0.1	7.0	Repelente
Ácido taurocólico	2.6885	537.7	50	0.1	7.0	Repelente
Ácido quenodeoxicólico	2.073	414.6	50	0.1	7.0	Repelente
L- glutamato (monosodio)	0.9357	187.13	50	0.1	7.0	Atrayente

* Paster y Gibbons (1986); Hugdahl, Beery y Doyle (1988).

Nota: para preparar los AQ's a doble concentración (2x), adicionar el doble de gramos de cada uno en el mismo volumen.

▲ **BUFFER DE MUESTRA 6x**

25 mg	Azul de Bromofenol
25 mg	Xilenecianol FF
4 g	Sucrosa
10 ml	TAE 1x

▲ **BUFFER TAE 50x**

12.1 g	Tris base
28.55 ml	Ácido acético
5 ml	EDTA 0.5 M, pH 8.0
Aforar a 50 ml con agua destilada	

BUFFER TAE 1x

1 ml	TAE 50x
49 ml	Agua miliQ

▲ **SOLUCIÓN DE GENTAMICINA (250 µg/ml)**

12.5 mg	Sulfato de gentamicina
50 ml	Medio DMEM

▲ **SOLUCIÓN DE TRIPSINA (0.25%)**

0.25 %	Tripsina
0.2 %	EDTA
cbp 100 %	Agua miliQ

▲ **NARANJA DE ACRIDINA (0.01%)**

0.001 g	Naranja de acridina
10 ml	Solución Gey

♣ **CRISTAL VIOLETA (0.5%)**

0.05 g Cristal violeta
1 ml NaCl al 0.15 %

♣ **MTT (0.5%)**

5 mg MTT
1 ml PBS

♣ **EDTA**

0.2 g EDTA (sal disódica grado reactivo)
100 ml Solución A (10x)
900 ml Agua destilada
Nota: Esterilizar a 121 °C/15 min. y almacenar a 4 °C.

♣ **SOLUCIÓN A (10x)**

8 g NaCl
0.2 g KCl
0.2 g KH₂PO₄
1.44 g Na₂HPO₄•2H₂O
c.b.p. 100 ml Agua destilada
Nota: Esterilizar a 121 °C/15 min. y almacenar a 4 °C.

♣ **POLIMIXINA B (0.15%)**

0.15 g Polimixina B
c.b.p. 100 ml Medio DMEM
 con L-glutamina y SFB

RESUMEN CURRICULAR

Guadalupe Ismael Malagón Santiago

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Acentuación en Microbiología

Tesis: DETERMINACIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA DE *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* EN CEPAS NATIVAS MEXICANAS.

Campo de Estudio: Microbiología Sanitaria.

Datos Personales: Nacido en Querétaro, Querétaro el 2 de Mayo de 1979, hijo de Adela Santiago de Vicente y Leandro Malagón López.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Querétaro, grado obtenido Licenciado en Biología en 2006.

Experiencia Profesional: **1)** Microbiólogo, asistente de investigación de la Universidad Autónoma de Querétaro durante el 2004, **2)** Químico Analista en SILLIKER de 2005 a 2006, y **3)** Asesor/Consultor (profesionista independiente) de Microbiología, Diseño Experimental y Estadística en la UANL, en el ITESM-Campus Monterrey, en la industria de alimentos y en empresas de giro socio-económico, de 2004 a la fecha.

Guadalupe Ismael Malagón Santiago